

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Jéssica Tairine Keller

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA FRENTE A AGENTES
DE MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS**

**Santa Maria, RS
2018**

Jéssica Tairine Keller

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA FRENTE A AGENTES DE
MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS
2018

Keller, Jéssica Tairine

Avaliação da atividade fotodinâmica frente a agentes de micoses cutâneas e subcutâneas / Jéssica Tairine Keller.- 2018.

63 p.; 30 cm

Orientador: Sydney Hartz Alves

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Fungos filamentosos 2. Resistência 3. Terapia fotodinâmica 4. Tratamento I. Hartz Alves, Sydney II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Jéssica Tairine Keller. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua José Bonifácio, n.1555, Bairro Centro, Doutor Maurício Cardoso, RS. CEP: 98925-000
Fone: (55) 9 96039183; E-mail: jessicatairinekeller@gmail.com

Jéssica Tairine Keller

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA FRENTE A AGENTES DE
MICOSSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 24 de agosto de 2018:

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Larissa Finger Schaffer, Dra. (UFN)

Débora Alves Nunes Mario, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador Dr. Sydney Hartz Alves pela orientação, paciência, convívio e pela amizade durante esses 4 anos de LAPEMI. Tenho grande admiração pelo ser humano e pesquisador que és.

Aos meus pais João e Marisa, que me apoiaram desde o início da minha caminhada, sempre com muito incentivo, confiança e amor. Obrigada por serem meus exemplos, meu porto seguro e por sempre me mostrarem a importância do conhecimento. Amo vocês.

A minha irmã Bianca, pela amizade, companheirismo e incentivo. Agradeço por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis. Você foi muito importante pra mim durante essa etapa da minha vida. Amo muito você.

Ao meu namorado João Renato, por todo apoio e incentivo de sempre, mesmo que distante. Agradeço também pelas correções de inglês.

A todos os colegas do LAPEMI, laboratório que escolhi fazer parte desde a graduação. Em especial a Tarcieli e a Laura, as quais me ensinaram muito. Obrigada por tudo. Vanessa, Mari, Fernanda, obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração.

A Sandra, técnica do laboratório, pelo auxílio, pelo carinho, pela amizade e companheirismo.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento da minha pesquisa, que torceram por mim e acreditaram na minha capacidade.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA FRENTE A AGENTES DE MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS

AUTORA: Jéssica Tairine Keller
ORIENTADOR: Sydney Hartz Alves

As micoses cutâneas e subcutâneas acometem tanto indivíduos imunocompetentes como indivíduos imunocomprometidos. Geralmente os tratamentos terapêuticos prolongados e as recorrências durante o tratamento são bastante comuns. *Scopulariopsis brevicaulis* é agente de micoses cutâneas, sobretudo de onicomiose. *Fonsecaea pedrosoi* e *Scedosporium apiospermum* são agentes de cromoblastomicose e micetomas, respectivamente. Esses agentes fúngicos mencionados são resistentes à maioria dos antifúngicos convencionais utilizados nos tratamentos. A terapia fotodinâmica então surge como uma alternativa ao tratamento dessas infecções localizadas de pele, combinando três fatores: fotossensibilizador, luz visível e oxigênio. A ativação do fotossensibilizador resulta na produção de espécies reativas de oxigênio que em uma sequência de reações fotoquímicas e fotobiológicas provocam a inativação da célula-alvo. Neste estudo foi avaliada a atividade fotodinâmica sobre *S. brevicaulis*, *F. pedrosoi* e *S. apiospermum*, utilizando-se fotossensibilizadores fenotiazínicos e um laser de diodo (InGaAlP). Os resultados demonstraram que a atividade fotodinâmica foi evidenciada frente a *S. brevicaulis* e *S. apiospermum*, quando se empregou o azul de metileno como fotossensibilizador. Por outro lado, quando se utilizou azul de toluidina como fotossensibilizador, os três agentes fúngicos testados evidenciaram sensibilidade à atividade fotodinâmica. O azul de metileno e o azul de toluidina são corantes quimicamente do grupo dos fenotiazínicos, e que funcionam como fotossensibilizadores fenotiazínicos catiônicos, sendo muito eficientes na produção de oxigênio singlete. Além disso, possuem uma ótima interação com a parede e a membrana plasmática fúngica. Os resultados desse estudo sugerem que a terapia fotodinâmica poderá se constituir numa alternativa de tratamento bastante promissora, todavia, estudos clínicos cuidadosamente conduzidos precisam ser desenvolvidos.

Palavras-chave: Micoses. Fungos filamentosos. Resistência. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

EVALUATION OF PHOTODYNAMIC ACTIVITY AGAINST CUTANEOUS AND SUBCUTANEOUS MYCOSES AGENTS

AUTHOR: Jéssica Tairine Keller

ADVISOR: Sydney Hartz Alves

Cutaneous and subcutaneous mycoses affect both immunocompetent individuals and immunocompromised individuals. Generally prolonged therapeutic treatments and, recurrences during treatment are quite common. *Scopulariopsis brevicaulis* is an agent of cutaneous mycoses, mainly onychomycosis. *Fonsecaea pedrosoi* and *Scedosporium apiospermum* are agents of chromoblastomycosis and mycetomas, respectively. These fungal agents are resistant to most of the conventional antifungal agents used in the treatments. Photodynamic therapy emerges as an alternative to the treatment of these localized skin infections, combining three factors: photosensitizer, visible light and oxygen. Photosensitizer activation results in the production of reactive oxygen species that in a sequence of photochemical and photobiological reactions generates the inactivation of the target cell. In this study the photodynamic activity on *S. brevicaulis*, *F. pedrosoi* and *S. apiospermum* was evaluated, using phenothiazine photosensitizers and a diode laser (InGaAlP). The results demonstrated that the photodynamic activity was evidenced against *S. brevicaulis* and *S. apiospermum*, when methylene blue was used as a photosensitizer. On the other hand, when toluidine blue was used as a photosensitizer, the three fungal agents tested showed sensitivity to photodynamic activity. Methylene blue and toluidine blue are chemically dye of the phenothiazines group, and function as cationic phenothiazine photosensitizers, being very efficient in the production of singlet oxygen. In addition, they have a good interaction with the wall and the fungal plasma membrane. The results of this study suggest that photodynamic therapy may be a very promising treatment alternative, however, clinical studies carefully conducted need to be developed.

Keywords: Mycoses. Filamentous fungi. Resistance. Photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.....	25
Figura 2 - Estrutura química do azul de metileno (A) e azul de toluidina O (B).....	27
ARTIGO	
Fig. 1 Effect of photodynamic inactivation using MB and laser light (InGaAIP) against <i>F. pedrosoi</i>	45
Fig. 2 Effect of photodynamic inactivation with TB and laser light (InGaAIP) against <i>F. pedrosoi</i>	45
Fig. 3 Effect of photodynamic inactivation with MB and laser light (InGaAIP) against <i>S. apiospermum</i>	46
Fig. 4 Effect of photodynamic inactivation with TB and laser light (InGaAIP) against <i>S. apiospermum</i>	46
Fig. 5 Effect of photodynamic inactivation with MB and laser light (InGaAIP) against <i>S. brevicaulis</i>	47
Fig. 6 Effect of photodynamic inactivation with TB and laser light (InGaAIP) against <i>S. brevicaulis</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de metileno
AT	Azul de toluidina
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fotossensibilizador
LAPEMI	Laboratório de Pesquisas Micológicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
TFD	Terapia fotodinâmica
UFC	Unidade formadora de colônia
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS	11
1.1.1	Objetivo geral	11
1.1.2	Objetivos específicos	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS	12
2.1.1	Micoses cutâneas	12
2.1.2	Micoses subcutâneas	14
2.2	AGENTES ESPECÍFICOS DE MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS	15
2.2.1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	15
2.2.1.1	<i>Tratamento</i>	16
2.2.2	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	17
2.2.2.1	<i>Tratamento</i>	18
2.2.3	<i>Scedosporium apiospermum</i>	19
2.2.3.1	<i>Tratamento</i>	20
2.3	TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD): UMA ALTERNATIVA DE TRATAMENTO PARA MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS	21
2.3.1	Lasers: Generalidades e Mecanismos de ação	23
2.3.1.1	<i>Classificação dos lasers e modo de ação</i>	23
2.3.2	Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica	24
2.4	FOTOSENSIBILIZADORES FENOTIAZÍNICOS	26
2.4.1	Terapia fotodinâmica aplicada a micro-organismos utilizando fotossensibilizadores fenotiazínicos	27
3	ARTIGO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA FRENTE A AGENTES DE MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS	30
4	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Scopulariopsis brevicaulis é agente de micoses cutâneas e está relacionado principalmente a onicomicoses (BONIFAZ; CRUZ-AGUILAR; PONCE, 2007). *S. brevicaulis* é um fungo filamentoso não dermatofítico e por isso, o tratamento para onicomicose causada por esse agente é bastante complexo e insatisfatório (DEL PALACIO; PAZOS; CUÉTARA, 2001; MORENO; ARENAS, 2010), pois se trata de uma infecção crônica onde as recidivas são frequentes (SALAS-CAMPOS; CHAVEZ-MADRIGAL, 2004).

Fonsecaea pedrosoi e *Scedosporium apiospermum* são agentes de micoses subcutâneas que predominam em regiões tropicais e subtropicais. Esses agentes são fungos saprofíticos que vivem no solo e na vegetação (WELSH et al., 2014), invadindo a pele e o tecido subcutâneo. *F. pedrosoi* é o principal agente de cromoblastomicose, doença fúngica normalmente descrita em braços e pernas de trabalhadores, que estão constantemente em contato com o solo (BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004). Essa doença apresenta dificuldades no tratamento, tanto farmacológico como não farmacológico (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010). *S. apiospermum* é um agente de micetoma, infecção subcutânea crônica causada pela inoculação de fungos filamentosos que formam grãos nos tecidos afetados (VAN DE SANDE, 2013) e assim como *S. brevicaulis* e *F. pedrosoi* é também resistente à maioria dos antifúngicos convencionais (LACKNER et al., 2011; MORIO et al., 2010; NEGRONI et al., 2005).

A terapia fotodinâmica (TFD) nos últimos anos surgiu como uma abordagem alternativa promissora aos antifúngicos convencionais, devido a sua eficiência e baixo caráter invasivo. A TFD já mostrou ser efetiva frente a múltiplos patógenos fúngicos *in vitro* (ARBOLEDA et al., 2014; BALTAZAR et al., 2015; LYON et al., 2013; MARIO et al., 2014; MORTON; CHAU; STACK, 2014; PIRES et al., 2013) e aplicados com sucesso *in vivo* contra micoses cutâneas e subcutâneas (GILABERTE et al., 2011; LYON et al., 2011; SOUZA; SOUZA; BOTELHO, 2014).

A TFD é uma modalidade terapêutica utilizada para o tratamento de tumores superficiais e infecções locais que combina a utilização de fármacos fotossensíveis, conhecidos como fotossensibilizadores (FS), ativados por luz em comprimento de onda específico. A ativação desses FSs pela luz conduz essas moléculas a

situações de grande instabilidade química que serão estabilizadas pela transferência de energia do FS às moléculas do meio. Formam – se, na presença de oxigênio, íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas, gerando uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs). A liberação dessas EROs promove o efeito citotóxico da TFD sobre as células alvo (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MAISCH, 2007; TAKASAKI, 2009).

As dificuldades que esses agentes de micoses cutâneas e subcutâneas apresentam em relação ao tratamento, torna necessária a busca por novas alternativas terapêuticas, sendo a TFD uma opção bastante promissora.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade *in vitro* da TFD frente a *S. brevicaulis*, *F. pedrosoi* e *S. apiosmermum* utilizando fotossensibilizadores fenotiazínicos e laser de diodo (InGaAIP).

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar qual a melhor concentração de azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT) a ser utilizada na técnica para avaliação da atividade fotodinâmica;
- b) Avaliar qual a melhor dose de energia a ser utilizada na técnica para avaliação da atividade fotodinâmica;
- c) Comparar qual o melhor fotossensibilizador a ser utilizado na técnica para avaliação da atividade fotodinâmica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS

2.1.1 Micoses cutâneas

As infecções fúngicas são eventos crescentes e desafiadores em todo mundo e podem acometer tanto indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos. Os patógenos fúngicos, em pacientes imunocomprometidos, podem resultar em infecções que variam de assintomáticas até disseminadas podendo ser letais (COWEN, 2008).

As micoses cutâneas são extremamente comuns, frequentemente recorrentes e crônicas. Estima-se que 10 - 20% da população mundial podem ser afetadas (DRAKE et al., 1996; EL-GOHARY et al., 2014). Essas micoses raramente são fatais, mas podem resultar em morbidade, causar desconforto, desfiguramento, isolamento social e podem predispor a infecções secundárias (BROWN et al., 2012). Os tratamentos precisam de terapia a longo prazo e muitas vezes não são resolutivos (PFALLER, 2012).

As principais doenças fúngicas cutâneas são causadas por *Malassezia* spp. e por dermatófitos (WHITE et al., 2014). *Malassezia* spp. são habitantes comensais do couro cabeludo e da pele que podem causar doenças, incluindo dermatite seborreica, caspa e pitíriase versicolor (GAITANIS et al., 2013). Essas infecções estão associados a 70 - 75% dos indivíduos imunossuprimidos e mais ou menos 50% dos distúrbios dérmicos em humanos saudáveis (WHITE et al., 2014). Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos que são os agentes etiológicos das doenças que afetam a pele, cabelos e unhas, ou seja, as dermatofitoses. Os dermatófitos produzem enzimas que digerem a queratina, a qual os fungos utilizam como fonte nutricional, facilitando sua capacidade de infectar tecidos que contenham a queratina (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). Indivíduos imunocomprometidos apresentam maior risco de dermatofitoses, incluindo a progressão para doença disseminada (NENOFF et al., 2014).

Dermatófitos são a causa mais comum de onicomicoses, particularmente *Trichophyton rubrum*, o agente etiológico mais comum (MIDGLEY; MOORE, 1998;

NENOFF et al., 2014; PEREA et al., 2000; RELLOSO et al., 2012; SIGURGEIRSSON; BARAN, 2013). A infecção das unhas causada por dermatófitos é chamada de *Tinea unguium* (AYATOLLAHI MOUSAVI; SALARI; HADIZADEH, 2015), causando mais de 90% das infecções nas unhas dos pés e 50% das infecções nas unhas das mãos (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015). Os fungos filamentosos não dermatófitos como *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Acremonium spp.* e *Scopulariopsis brevicaulis* causam entre 2% e 13% dos casos (ELEWSKI et al., 2013; GARMENDIA; VIEDMA; ARZA, 2008; LOPEZ-JODRA; TORRES-RODRIGUEZ, 1999; MORENO; ARENAS, 2010), enquanto as leveduras são responsáveis por cerca de 21% das onicomicoses (GARMENDIA; VIEDMA; ARZA, 2008; SIGURGEIRSSON; BARAN, 2013).

De acordo com a Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (SIMHA), as onicomicoses são infecções fúngicas invasivas das unhas, sem considerar o agente causador (ODDS et al., 1992), e são consideradas como uma das infecções fúngicas mais comuns e, cada vez mais prevalente. Essas infecções ocorrem como resultado da penetração do fungo na placa da unha (MOTAMEDI et al., 2016). As onicomicoses representam até 50% das onicopatias e aproximadamente 30% de todas as dermatomicoses (ELEWSKI, 2000). É uma doença muito comum em adultos (THOMAS et al., 2010), estando associada a diferentes fatores predisponentes associados à ocupação, classe social, idade e clima, bem como uma série de doenças subjacentes, como diabetes, doença vascular periférica, imunodeficiência e psoríase (LOO, 2007; THOMAS et al., 2010).

A onicomicose não dermatofítica é causada por fungos filamentosos hialinos (HATTORI et al., 2005; RAMANI; RAMANI; SHIVANANDA, 1994) ou demáceos (BARDE; SINGH, 1983; ROMANO; PACCAGNINI; DIFONZO, 2001) que são comumente encontrados como saprófitos do solo ou patógenos de plantas. Ao contrário dos dermatófitos, eles geralmente não são queratinolíticos (FARWA et al., 2011) e habitam o cimento intercelular não queratinizado do tecido hospedeiro e devem tirar proveito da destruição anterior da queratina por dermatófitos, trauma ou outra doença das unhas. Por estas razões, às vezes são considerados invasores secundários da placa de unhas (RIPPON, 1988).

As onicomicoses são uma das micoses superficiais mais difíceis de tratar, pois são infecções crônicas sujeitas a frequentes recidivas. Devido a isso, é

importante identificar o agente causador para garantir que o tratamento apropriado seja empregado para cada caso (SALAS-CAMPOS; CHAVEZ-MADRIGAL, 2004).

2.1.2 Micoses subcutâneas

As micoses subcutâneas, também referidas como micoses de implantação (SAMAILA; ABDULLAHI, 2011), compreendem a invasão da pele e tecido subcutâneo por fungos saprofitos que vivem no solo e na vegetação (WELSH; ARENAS, 2012). As micoses subcutâneas mais comuns são a esporotricose, a cromoblastomicose e os micetomas. Ainda de menor ocorrência são a lacaziose, a rinosporidiose e as entomofotoromicoses, que incluem a conidiobolomicose e a basidiobolomicose (WELSH; ARENAS, 2012).

A esporotricose é uma infecção subaguda ou crônica causada por fungos dimórficos, sendo a espécie mais comum *Sporothrix schenckii* (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; RAMOS E SILVA et al., 2012). Esses fungos são universais, embora sejam mais comuns em áreas tropicais e subtropicais. A incidência estimada de esporotricose na América do Sul é de 48 a 60 casos por 100.000 habitantes por ano (LYON et al., 2003; PAPPAS et al., 2000). *Sporothrix* spp. vivem em vegetação, plantas ou detritos vegetais no solo e, portanto, infecções são mais comuns em trabalhadores agrícolas e pessoas que trabalham em áreas abertas (CRUZ; VIEILLE; OSCHILEWSKI, 2012; RAMOS E SILVA et al., 2012).

A cromoblastomicose, também conhecida como cromomicose, é uma infecção fúngica polimórfica crônica da pele e tecido subcutâneo. É causada por várias espécies de fungos melanizados ou dematiáceos, que produzem um pigmento escuro (KRZYSCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYNSKA; PIASZCZYNSKI, 2014; NAMRATHA et al., 2010; PINDYCKA-PIASZCZYNSKA et al., 2014; TORRES-GUERRERO et al., 2012). A maioria dos pacientes tem história de lesão traumática envolvendo madeira ou vegetação, e mais de 80% são trabalhadores rurais da África, Ásia e América do Sul que têm o hábito de caminhar com os pés descalços. Os fungos responsáveis pela cromoblastomicose foram encontrados em todo o mundo, embora sejam mais comuns nos países tropicais e subtropicais (TORRES-GUERRERO et al., 2012).

As espécies mais comuns que causam cromoblastomicose são *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea monophora*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa* e *Rhinochyladiella acquaspersa* (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; NAMRATHA et al., 2010; TORRES-GUERRERO et al., 2012).

Os micetomas constituem-se em enfermidades infecciosas crônicas, subcutâneas, do tipo granulomatosa, sendo endêmica em regiões tropicais e subtropicais, podendo ser causada por bactérias (actinomicetomas) ou fungos (eumicetomas) (ZIJLSTRA et al., 2016). As lesões são mais comuns nos pés, nas canelas e nas mãos. A primeira manifestação clínica é um nódulo duro e indolor que se espalha lentamente para produzir pápulas e vesículas que descarregam líquido contendo grânulos na superfície da pele (ESTRADA et al., 2012; JEREZ et al., 2012).

Os grãos apresentam coloração escura ou negra quando estão envolvidos agentes como: *Madurella mycetomatis*, *Trematosphaeria grisea*, *Falciformispora senegalensis* (*Leptosphaeria senegalensis*), *Falciformispora thompkinsii*, *Exophiala jeanselmei*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Curvularia luneta* e *Phialophora verrucosa*, entre outros agentes; grãos claros ou esbraquiçados são causados por: *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Nostedina rosatti* e *Microsporum audouinii* (NENOFF et al., 2015). Os actinomicetomas podem produzir grãos comumente de cor vermelho (*Nocardia brasiliensis*) ou amarelo (*Streptomyces* spp.), mas também podem produzir grãos brancos, de modo que o diagnóstico microbiológico é fundamental para se diferenciar eumicetoma de actinomicetoma (HJIRA et al., 2015)

2.2 AGENTES ESPECÍFICOS DE MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS

2.2.1 *Scopulariopsis brevicaulis*

O gênero fúngico *Scopulariopsis* é um ascomiceto que inclui espécies hialinas e melanizadas que são saprófitas do solo e apresentam uma ampla distribuição geográfica. As espécies de *Scopulariopsis* são comumente isoladas do ar, madeira, matéria orgânica em decomposição, estrume e restos de animais (HOOG et al., 2014), mas ocasionalmente estão envolvidos em infecções humanas. Eles são

principalmente relacionados à onicomicoses (BONIFAZ; CRUZ-AGUILAR; PONCE, 2007), ceratites (AYDIN et al., 2007), otomicoses (ISSAKAINEN et al., 2010) e infecções cutâneas (WU et al., 2009), embora infecções disseminadas também tenham sido associadas a altas taxas de mortalidade em imunocomprometidos (IWEN et al., 2012; SHAVER et al., 2014; YANG; WEI; CHEN, 2012) e, mais raramente, em pacientes imunocompetentes (CAWCUTT; BADDOUR; BURGESS, 2015; HART et al., 2001).

As espécies identificadas em infecções humanas incluem *S. acremonium*, *S. americana*, *S. brevicaulis*, *S. brumptii*, *S. candida*, *S. fusca*, *S. hominis* (ISSAKAINEN et al., 2007; NAIDU; SINGH; POURANIK, 1991). *Scopulariopsis brevicaulis* é a espécie mais comumente isolada de infecções humanas sendo relatado como o agente causador de 1 - 10% dos casos das onicomicoses não dermatofíticas (MORENO; ARENAS, 2010).

Em um estudo retrospectivo publicado em 2015, onde foram analisados 16.815 resultados de testes de pacientes com suspeita de micoses superficiais, 7.193 amostras foram positivas para fungos e dessas, 255 foram identificadas como *S. brevicaulis*. Em 10.470 amostras de unhas que foram coletadas, a onicomicose foi diagnosticada em 4.806 casos e desses, 218 foram identificados como *S. brevicaulis* (MACURA; SKÓRA, 2015).

Esse estudo também mostrou que a prevalência mais comum de *S. brevicaulis* é nas unhas dos pés (80%), tanto em mulheres quanto em homens (MACURA; SKÓRA, 2015).

2.2.1.1 Tratamento

O tratamento das onicomicoses que são causadas por fungos filamentosos não dermatofíticos é complexo e insatisfatório, muito mais difícil e desafiante que para os dermatófitos (DEL PALACIO; PAZOS; CUÉTARA, 2001; MORENO; ARENAS, 2010). Durante as últimas três décadas, um número crescente de infecções graves por *S. brevicaulis* foi relatado em pacientes imunocomprometidos (IWEN et al., 2012) com infecções invasivas frequentemente fatais (TORTORANO et al., 2014). O tratamento ideal para as infecções por *S. brevicaulis* ainda não foi definido (TORTORANO et al., 2014).

Muitos autores têm relatado que *S. brevicaulis* é resistente *in vitro* a todos os agentes antifúngicos conhecidos com altas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os compostos anfotericina B, flucitosina e azólicos, tornando difícil erradicá-lo (CARILLO-MUNOZ et al., 2005; CUENCA-ESTRELLA et al., 2003; CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; SKORA; BULANDA; JAGIELSKI, 2015).

Cuenca – Estrella e colaboradores em 2006 relataram a atividade de 10 combinações de antifúngicos frente a 25 isolados clínicos de *S. brevicaulis*, observando que o efeito médio foi indiferente para todas as combinações. O sinergismo foi observado para alguns isolados quando combinou – se terbinafina e posaconazol (68% das cepas), anfotericina B e caspofungina (60%) e caspofungina e posaconazol (48%) (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006). Outro estudo realizado em 2014 avaliou a atividade antifúngica de anfotericina B, terbinafina, ciclopirox, itraconazol, cetoconazol e voriconazol frente a 40 isolados de *S. brevicaulis* e os resultados mostraram que o itraconazol apresentou a maior CIM de 16 mg/L. Para anfotericina B, voriconazol e cetoconazol as CIMs variaram de 4 a > 16 mg/L, 8 a > 16 mg/L e 8 a > 16 mg/L, respectivamente. A melhor atividade foi encontrada com terbinafina, CIM de 0,5 a 16 mg/L e ciclopirox com CIM de 1 a 8 mg/L (SKÓRA; MACURA; BULANDA, 2014).

As altas CIMs para muitos antifúngicos obtidas na maioria dos estudos sugerem que *S. brevicaulis* é multirresistente (SKÓRA; MACURA; BULANDA, 2014) e devido a isso, torna necessário à busca de novas possibilidades terapêuticas.

2.2.2 *Fonsecaea pedrosoi*

A cromoblastomicose é a mais comum das várias micoses causadas por fungos melanizados ou negros, e a melanina presente na parede celular desses agentes é um importante fator de patogenicidade (REVANKAR; SUTTON, 2010). Agentes de cromoblastomicose são encontrados no solo, espinhos e detritos de plantas (GEZUELE; MACKINNON; CONTI-DÍAZ, 1972; TSCHEN et al., 1984).

. O fungo demáceo *Fonsecaea pedrosoi* é o principal agente etiológico de cromoblastomicose, uma micose crônica e granulomatosa, geralmente confinada à pele e tecidos subcutâneos (HAMZA et al., 2003). Predominante em áreas tropicais e subtropicais, essa doença é normalmente descrita em braços e pernas de

trabalhadores, que estão constantemente em contato com o solo, onde *F. pedrosoi* cresce como um saprófita (BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004).

A cromoblastomicose raramente ocorre antes da adolescência, com a maioria dos pacientes na faixa etária entre 40 e 50 anos de idade, com uma proporção entre homens e mulheres de 5:1 e 9:1 (AL-DOORY, 1983; QUEIROZ-TELLES et al., 2009; QUEIROZ-TELLES et al., 2011). No Brasil, a taxa de incidência estimada de cromoblastomicose é de 3/100.000 (QUEIROZ-TELLES et al., 2011). Os principais fatores de risco associados à infecção por cromoblastomicose são: falta de calçados de proteção, luvas ou roupas, má nutrição e hábitos higiênicos (AL-DOORY, 1983).

2.2.2.1 Tratamento

A cromoblastomicose é extremamente difícil de tratar e muitas vezes é refratária a diversas opções, incluindo tratamentos não farmacológicos, como curetagem, eletrocoagulação e criocirurgia (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010). A eficácia da terapia pode estar relacionada à gravidade e duração da doença, ao agente etiológico e à adesão do paciente. Os estudos comparativos sobre essa doença são escassos e as evidências que ajudam a selecionar a melhor terapia são baseadas em poucos estudos clínicos e opiniões de especialistas e, devido a isso não existe uma terapia “padrão ouro” para a cromoblastomicose (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012, 2013).

Em um estudo realizado por Bonifaz e colaboradores em 2005, mostrou que a terbinafina é um medicamento eficaz no tratamento da cromoblastomicose, por ser um medicamento bem tolerado e com efeitos colaterais mínimos (BONIFAZ et al., 2005). Entre os vários compostos já utilizados, terbinafina e itraconazol são indicados como terapias de primeira linha e o posaconazol em casos refratários (GRANT; CLISSOLD, 1989). Já foram reportadas infecções por *F. pedrosoi* resistentes ao itraconazol (ANDRADE et al., 2004) e as taxas de cura utilizando monoterapia com itraconazol ou terbinafina variam de 15 a 80%, o que em média é insuficiente (QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

Um estudo *in vitro* realizado em 2018, mostrou que a combinação de anfotericina B e terbinafina teve efeito sinérgico contra a maioria dos fungos

melanizados associados a cromoblastomicose, sugerindo que essa combinação poderia fornecer uma opção para o tratamento de casos severos ou que não respondem ao tratamento de cromoblastomicose (DENG et al., 2018).

Os antifúngicos devem ser mantidos pelo menos durante 6 meses e, embora possam produzir um resultado clínico favorável, as recorrências durante ou após a terapia são comuns (TORRES-GUERRERO et al., 2012). Devido a isso, estratégias terapêuticas alternativas empregando novos agentes antifúngicos e/ou combinação de drogas (ANTONELLO et al., 2010; GUPTA; TABORDA; SANZOVO, 2002; PANIZ-MONDOLFI et al., 2008; PARK et al., 2005) podem ser promissoras no tratamento da cromoblastomicose de forma mais eficiente.

2.2.3 *Scedosporium apiospermum*

Micetoma é uma infecção subcutânea crônica causada pela inoculação de fungos filamentosos (eumicetoma) ou bactérias filamentosas aeróbias (actinomicetoma) que formam grãos nos tecidos afetados (VAN DE SANDE, 2013). Micetoma é considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 2013 e permanece sem qualquer programa de controle para prevenção ou vigilância (VAN DE SANDE, 2013; WELSH et al., 2014). Embora ocorra em todo o mundo, prevalece em regiões tropicais e subtropicais, especialmente nas áreas sub-saarianas da África, Índia e México (MOHAMED; FAHAL, 2016; ZEIN et al., 2012). Na América do Sul, casos de micetoma foram reportados na Venezuela, Colômbia, Brasil e Argentina (FAHAL, 2011; VAN DE SANDE, 2013; ZEIN et al., 2012) com maior incidência entre trabalhadores rurais com idades entre 20 e 40 anos (FAHAL et al., 1994; WELSH; VERA-CABRERA; SALINAS-CARMONA, 2007).

Scedosporium apiospermum é um dos agentes de micetoma, apresentando grãos de coloração branca na superfície da pele afetada (NENOFF et al., 2015). A infecção se desenvolve devido a implantação traumática do fungo na pele das mãos ou dos pés (70 – 80%) mais comumente, com uma resposta inflamatória granulomatosa na derme profunda e no tecido subcutâneo (FAHAL, 1994). *S. apiospermum* foi isolado pela primeira vez em 1909 na Sardenha por Tarozzi (AJELLO, 1952; TAROZZI, 1909) e é encontrado na água, esgoto, solo, pântanos e

esterco (CORTEZ et al., 2008; KANTARCIOGLU; DE HOOG; GUARRO, 2012). Essa espécie foi considerada o anamorfo de *Scedosporium boydii* (anteriormente conhecido como *Pseudallescheria boydii*) até 2005, quando se provou serem duas espécies distintas com base em dados moleculares, fisiológicos e bioquímicos (GILGADO et al., 2005).

2.2.3.1 Tratamento

Em contraste com o sucesso do tratamento obtido com antimicrobianos em actinomicetoma, o tratamento de eumicetoma (causado por fungos verdadeiros) continua sendo um desafio. O cetoconazol foi a base do tratamento por décadas, até que em 2013 seu uso foi restringido pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, devido as lesões hepáticas potencialmente fatais, interações medicamentosas e problemas nas glândulas suprarrenais (FDA, 2013).

Foram relatados resultados aceitáveis para o uso de triazóis de última geração, como o itraconazol e o fluconazol usados isoladamente ou em combinação com a terbinafina. Estas drogas são administradas durante um longo período e só depois de esgotar todas as opções cirúrgicas (ESTRADA et al., 2012; WELSH et al., 2014). O itraconazol é considerado como terapia “padrão ouro” para eumicetoma (GÜNDÜZ et al., 2006; LEE et al., 1995). Embora esse antifúngico não seja curativo, reduz o tamanho da lesão com formação de fibrose, permitindo uma cirurgia menos mutiladora (FAHAL et al., 2011). A terbinafina não foi eficaz em infecções profundas contra *S. apiospermum* (LACKNER et al., 2011; MORIO et al., 2010), mas em um relato de caso publicado em 2017, mostrou eficácia no tratamento juntamente com a excisão cirúrgica (TÓTH et al., 2017).

Na América do Sul (Argentina, Peru, Colômbia e Brasil) em 5 de 6 pacientes com eumicetoma, o posaconazol se mostrou eficaz e levou a uma remissão completa do micetoma. O paciente que não respondeu ao tratamento apresentava micetoma por *S. apiospermum* (NEGRONI et al., 2005). O voriconazol também já tem sido utilizado em alguns casos de micetoma (AMEEN; ARENAS, 2009; LACROIX et al., 2005; LOULERGUE et al., 2006). Em 2013, Oliveira e colaboradores descreveram um caso de eumicetoma por *S. apiospermum* em um paciente imunocompetente que foi tratado com sucesso utilizando como terapia o

voriconazol oral (OLIVEIRA et al., 2013). A terapia antifúngica combinada foi relatada em apenas um caso, quando após uma falha no tratamento com fluconazol e anfotericina B, o paciente foi curado com sucesso com a combinação de voriconazol e caspofungina (BEIER et al., 2010). A excisão cirúrgica isolada, sem terapia antifúngica, foi aplicada em um caso (SOPTA et al., 2005), enquanto a amputação sem tentar qualquer tratamento antifúngico foi realizada uma vez na Turquia (KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2005). Terapia com Itraconazol mais cirurgia foi utilizada no caso descrito por Monteroa e colaboradores (MONTEROA et al., 2004).

O diagnóstico correto de eumicetoma de grão branco por *S. apiospermum* é importante, porque esse agente é resistente a uma variedade de antimicóticos comumente usados.

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD): UMA ALTERNATIVA DE TRATAMENTO PARA MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS

Em comparação com a terapia antibacteriana, o tratamento antifúngico é limitado, devido ao número reduzido de fármacos disponíveis. Na maioria das vezes, o tratamento é prolongado, os efeitos colaterais são graves e as interações medicamentosas são comuns (HAY, 1999; KATZ, 1997). Em muitos casos, o tratamento é ineficaz (COHEN; SCHER, 1994; WALSH et al., 2000). Além disso, os fungos tornaram-se cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos em pacientes com doenças críticas (JOHNSON et al., 1995), em consequência do imunocomprometimento e, neste cenário, a emergência da resistência de espécies fúngicas aos agentes antifúngicos (BLIGNAUT et al., 2005; DENNING, 1995; DODGSON et al., 2004; JOHNSON et al., 1995; PUJOL; PFALLER; SOLL, 2004; WALSH et al., 2000). Devido a isso, tem-se buscado ativamente novas alternativas de tratamento. A TFD é uma dessas alternativas, com potencial limitado ao tratamento de infecções tópicas.

A TFD consiste na combinação de três fatores: a) agente fotossensibilizador (FS), que é capaz de se acumular seletivamente nos tecidos lesados ou de ser metabolizados pelas células alvo; b) da exposição à luz visível com comprimento de onda adequado e c) da presença de oxigênio (MENEZES, 2012). A ativação do FS resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como ânions superóxidos e o oxigênio singlete, que em uma sequência de reações fotoquímicas e

fotobiológicas provocam a inativação da célula-alvo (BLISS et al., 2004; KOCHEVAR et al., 1996; OLIVEIRA; MACHADO; PESSINE, 2005). Nos últimos anos esta técnica tem sido muito empregada para o tratamento de neoplasias, principalmente as cutâneas (BAHNER; BORDEAUX, 2013; MROZ et al., 2013), e para a inativação de micro-organismos (EAGLESOME et al., 1994; JORI et al., 2011; PIRES et al., 2012).

Existem documentos de 2000-1200 a.C. mostrando que os egípcios, chineses e indianos, usavam combinações de extratos de plantas com exposição à luz solar para tratar distúrbios de pele (CRAIG et al., 2015; PATHAK; FITZPATRICK, 1992). Os egípcios usaram a aplicação de um extrato de *Ammi majus*, uma planta contendo furanocumarina, associada à exposição solar para tratar vitiligo tópico. Na medicina tradicional indiana, um extrato de *Psoralea corylifolia*, que também é uma furanocumarina, era utilizado de maneira semelhante no vitiligo (PATHAK; FITZPATRICK, 1992).

Contudo, a proposta moderna de TFD foi iniciada em 1900 por Tappeiner e seus colegas de trabalho na Alemanha (TAPPEINER, 1900). O primeiro relato da observação de que a combinação de luz e corante poderia ser prejudicial a uma célula foi publicado por Raab (1900), um aluno de Tappeiner. Raab relatou a morte do protozoário *Paramecium caudatum* após exposição à luz na presença de um corante de acridina. Após esse achado, em 1903, Tappeiner e o dermatologista Jesionek relataram como a aplicação tópica de eosina associada a exposição a luz branca tratou de forma eficaz um tumor de pele (JESIONEK; TAPPEINER, 1903). Tappeiner e seu colega Jodlbauer também observaram que o efeito fototóxico não ocorreu na ausência de oxigênio e introduziram o termo “ação fotodinâmica” em 1907 para descrever a reação (TAPPEINER; JODLBAUER, 1904; 1907). Mais tarde, foi empregada a luz branca através de lâmpadas convencionais, com as desvantagens da alta temperatura associada e da dificuldade em se calcular a dosagem da luz (TOREZAN; NIWA; NETO, 2009). Posteriormente, os lasers tiveram maior aplicabilidade devido à monocromaticidade, unidirecionalidade e facilidade de cálculo da dosimetria (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO; ZANIN, 2007).

2.3.1 Lasers: Generalidades e Mecanismos de ação

A palavra laser é uma abreviatura de “*Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation*”, que na língua portuguesa significa Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. O laser é uma radiação que se encontra no espectro de luz que varia do infravermelho ao ultravioleta, passando pelo espectro visível (BASSANI; BASTOS, 1992; BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; GENOVESE, 2000; MELLO; MELLO, 2001; ROBERTS-HARRY, 1994).

Albert Einstein, em 1916, formulou os princípios da amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, quando percebeu em seu experimento que a emissão induzida poderia existir e a radiação eletromagnética seria produzida por um processo atômico (BASSANI; BASTOS, 1992; BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; GENOVESE, 2000; MELLO; MELLO, 2001). Theodoro H. Maiman, em 1960, desenvolveu o primeiro aparelho emissor de laser a cristal de rubi, que passou a ser comercializado e em seguida, foi realizada a primeira intervenção cirúrgica com o laser. Em 1965, Sinclair e Knoll desenvolveram o laser terapêutico, não mais com efeito de corte, mas de bioestimulação dos tecidos (BASSANI; BASTOS, 1992; BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

A luz laser oferece uma segurança ao ser utilizada, e difere das outras formas de luz devido a principalmente três características: monocromaticidade, unidirecionalidade e facilidade de cálculo da dosimetria (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO; ZANIN, 2007).

2.3.1.1 Classificação dos lasers e modo de ação

Os aparelhos de laser são constituídos por um meio ativo, que pode ser sólido (rubi), gasoso (mais comuns, como exemplo o CO₂, He - Ne, Ar), semicondutor (Diodo - AsGaAl, AsGa), semissólido (Nd - YAG, Er - YAG, YAP), Excímero (KrF, XeCl) ou líquido (pouco usados) (BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; GENOVESE, 2000; MELLO; MELLO, 2001).

Os lasers são classificados de acordo com a potência de emissão da radiação podendo ser: laser de alta, média e baixa intensidade.

Os lasers de alta intensidade, também conhecidos como laser cirúrgico, emitem radiação de alta potência, o que propicia um potencial destrutivo, sendo utilizados para viabilizar cirurgias ou remoção de tecido cariado, ou seja, possui uma ação fototérmica de corte, vaporização, coagulação e esterilização dos tecidos. Os principais lasers de alta intensidade são o Excimer, Argônio, Kriptônio, Dye, Rubi, Família YAG (ítrio – alumínio - granada) e CO₂ (BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; GENOVESE, 2000; MELLO; MELLO, 2001). Os lasers de média intensidade emitem radiações com potências medianas, sem poder destrutivo, sendo mais utilizados em fisioterapia. Entre eles se encontram o laser de Hélio - Neônio (He-Ne) e o Arseniato de gálio (AsGa) (GENOVESE, 2000). Os lasers de baixa intensidade, também denominado laser terapêutico, emitem radiações de baixas potências, sem potencial destrutivo, e possuem uma ação fotoquímica de analgesia, anti-inflamatória e de bioestimulação tecidual. Entre os lasers de baixa intensidade encontram-se os lasers: He-Ne (Hélio - Neônio), diodo (Arseniato de gálio – AsGa) e Arseniato de gálio e alumínio (AsGaAl) (BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; GENOVESE, 2000; MELLO; MELLO, 2001).

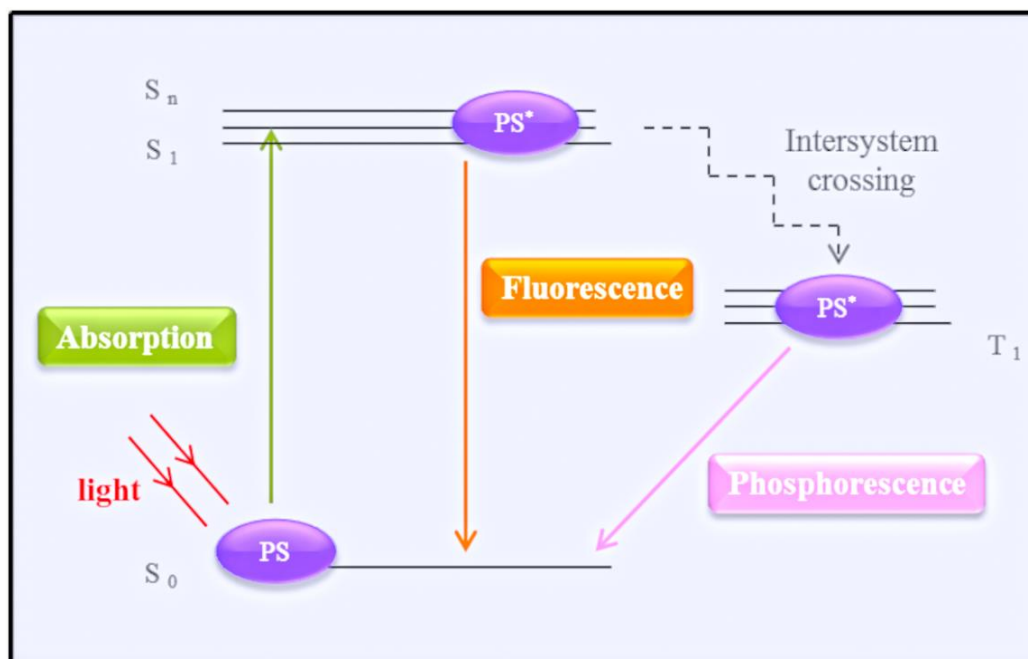
2.3.2 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

A TFD é um tratamento que utiliza uma combinação de luz, uma substância química conhecida como FS que é capaz de ser ativada pela luz e pelo oxigênio, provocando um efeito citotóxico. A TFD induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) (DAI et al., 2012; HAMBLIN; HASAN, 2004).

O processo envolve a emissão de luz num comprimento de onda capaz de excitar o FS, o qual absorve um fóton e passa do estado fundamental (S_0) para o primeiro estado excitado singlete (S_1). Esse estado de excitação tem um tempo de vida muito curto e, assim, o FS pode retornar ao estado fundamental através de processos radioativos como, fluorescência ou fosforescência, ou não radioativos como interconversão ou cruzamento intersistemas. No cruzamento intersistemas, a molécula do FS passa do estado S_1 para o estado excitado tripleto (S_3), sendo esse

estado responsável por originar o efeito fotossensibilizante, podendo participar de reações fotodinâmicas produzindo EROs (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; HAMBLIN et al., 2002; MENEZES, 2012; RODRIGUES, 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica



Fonte: Baltazar et al. (2015).

Podem ocorrer dois tipos de reações fotodinâmicas, as quais são chamadas tipo I e tipo II. Na reação tipo I, o FS no estado triplete transfere diretamente um elétron ou um átomo de hidrogênio para uma biomolécula, produzindo intermediários reativos como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^-), óxido nítrico (NO) e nitrito de peróxido (ONOO) (BALTAZAR et al., 2013; HAMBLIN; HASAN, 2004). A reação fotodinâmica que ocorre com os FSs atuais segue, principalmente, o mecanismo tipo II. Na reação do tipo II, o FS transfere energia para o oxigênio molecular produzindo oxigênio singlete (1O_2), o qual é um oxidante extremamente poderoso com um tempo de meia vida muito curto, mas que pode reagir com diversas biomoléculas, como lipídios e proteínas (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Um aspecto importante da utilização de radicais oxidativos e nitroso-ativos obtidos por este processo e voltados a aplicações antimicrobianas, é que os alvos

celulares têm reduzida probabilidade de seleção de cepas resistentes, um problema frequente nas terapêuticas atuais (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; CALZAVARA-PINTON et al. 2012). Os radicais gerados pela TFD têm meia vidas extremamente curtas e reagem apenas em seus locais de formação, o que reduz sua toxicidade em tecidos normais adjacentes (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

Os radicais gerados alteram a estrutura da parede da membrana celular fúngica, proporcionando a translocação do FS para a célula. Posteriormente, os EROs e ERNs produzidos fora e dentro da célula fúngica causam um desequilíbrio na homeostase celular, resultando em morte celular por apoptose, necrose ou autofagia (MROZ et al., 2011).

2.4 FOTOSSENSIBILIZADORES FENOTIAZÍNICOS

O primeiro FS amplamente utilizado na medicina foi a hematoporfirina (Hp), obtida a partir de sangue ressecado e submetido a tratamento com ácido sulfúrico concentrado. A Hp foi primeiramente testada *in vitro* por Hausman (1911) na Áustria, onde demonstrou que o composto ativado era efetivo contra protozoários (*Paramecium* spp) e eritrócitos (SCHERER, 1841). No entanto, somente em 1993, no Canadá, que o primeiro FS a obter aprovação federal para uso clínico foi o *Photofrin*®, seguido de outros países, incluindo os Estados Unidos em 1995 (USUDA et al., 2006).

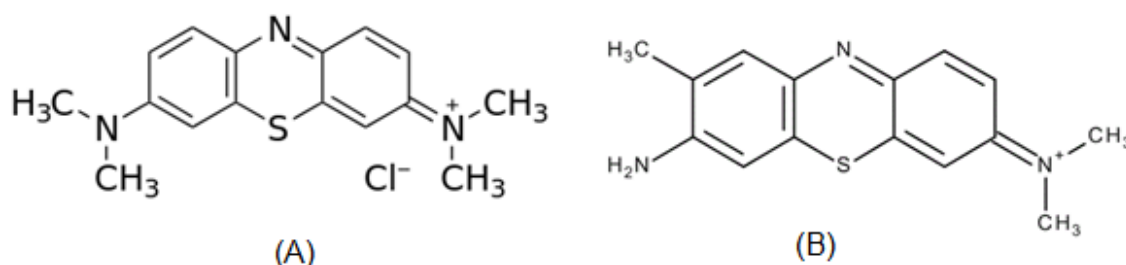
Os FSs são corantes com capacidade de absorver energia de uma fonte de luz e transferir essa energia para outra molécula (PLAETZER et al., 2009). O FS ideal para ser empregado na TFD deve congrega características como seletividade pelas células alvo, absorver a luz no espectro vermelho ou vermelho distante, ser hidrossolúvel e apresentar resposta biológica desejada (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). A maioria dos FSs deriva de corantes vitais e caracterizam-se por não apresentarem *a priori* toxicidade às células humanas nas concentrações requeridas para a técnica. Os corantes, de modo geral, possuem a propriedade de absorver luz visível eficientemente e possuem a habilidade de induzir ou participar de reações fotoquímicas (MACHADO, 2000). Podem ser administrados por via tópica, intralesional ou sistêmica antes da consecutiva exposição à luz (ORTH et al., 2000).

Os FS catiônicos são mais eficientes do que seus homólogos neutros ou aniônicos na morte fotodinâmica de células microbianas. Os FSs catiônicos são mais eficazes, especialmente como antibacterianos de amplo espectro, do que seus homólogos aniônicos (WAINWRIGHT, 1998).

Os principais FSs utilizados em ensaios clínicos modernos são os sais de fenotiazina, azul de toluidina O e azul de metileno (Figura 2), com comprimentos de onda de absorção de 600 - 660 nm (CALZAVARA-PINTON et al., 2012). Ambos são clinicamente aprovados para uso humano e podem efetivamente atuar sobre a membrana fúngica, causando danos estruturais (CALZAVARA-PINTON et al., 2012; DAI et al., 2012; PLAETZER et al., 2009).

Os FSs fenotiazínicos têm estruturas simples tricíclicas planares, tipicamente de natureza catiônica. Tanto o AT quanto o AM, são produtores eficientes de oxigênio singlete e o comprimento de onda de absorção máximo na água é 656 nm para o AM e 625 para o AT (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000).

Figura 2 - Estrutura química do azul de metileno (A) e azul de toluidina O (B)



Fonte: Bacellar et al. (2014).

2.4.1 Terapia fotodinâmica aplicada a micro-organismos utilizando fotossensibilizadores fenotiazínicos

Na TFD, a combinação de um fármaco e luz visível provoca destruição seletiva de células microbianas. A capacidade de combinações entre drogas e luz para destruir micro-organismos é conhecida há mais de 100 anos (MOAN; PENG, 2003). No entanto, foi na busca por tratamentos alternativos para patógenos resistentes aos antibióticos, que o fenômeno passou a ser investigado em detalhes. Numerosos estudos têm mostrado que a TFD é altamente eficaz na destruição *in*

vitro e *in vivo* de vírus e protozoários, bem como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

A TFD é eficaz em eliminar micro-organismos causadores principalmente de infecções localizadas na pele e na cavidade oral, uma vez que a principal vantagem dessa técnica está no fato não favorecer o desenvolvimento de resistência as EROs. Esta característica deve-se ao fato dessas moléculas atingirem diversos alvos no micro-organismo, provocando reações de oxidação, seja nos lipídeos, lisossomos, mitocôndrias, proteínas de membranas, e assim, promovendo a morte celular (MAISCH, 2009; PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012).

Candida albicans é efetivamente eliminada pela TFD com AM ou AT (WILSON; MIA, 1993), mas é muito menos suscetível quando comparada com várias bactérias procarióticas como, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes* e *Corynebacterium minutissimum* (ZEINA et al., 2002).

A observação de que a TFD frente às células procarióticas é mais efetiva do que frente às células eucarióticas, deve-se ao fato de que nas células procarióticas, a inativação ocorre de uma forma única, ou seja, o dano em apenas um alvo já é suficiente para causar a morte do micro-organismo. Por outro lado, acredita-se que nas células eucarióticas a membrana nuclear funcione como uma barreira para os produtos da reação fotodinâmica, explicando sua menor suscetibilidade (ZEINA et al., 2001). Mesmo assim, quando a inibição ou morte é observada, os mecanismos envolvem a perfuração de parede e de membranas celulares pelos radicais livres, permitindo que o FS seja transportado para o interior celular. A seguir, as EROs geradas pela luz de excitação, provocam danos em vários alvos celulares como, inativação enzimática, peroxidação dos lipídios, determinando a lise das membranas celulares, lisossomos, mitocôndrias, resultando em morte celular (BERTOLONI et al., 1989; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008).

Vários grupos investigaram a capacidade de *Streptococcus aureus* manter a viabilidade após a exposição ao AT e uma fonte de luz. Wilson e Yianni usando $12.5 \mu\text{gml}^{-1}$ de AT e luz de um laser de hélio-neon de baixa potência, relataram uma redução de $4,47 \log_{10}$ na contagem viável de uma espécie de *S. aureus resistente* à meticilina (MRSA) (WILSON; YIANNI, 1995). Usacheva e colaboradores compararam o uso de AM e AT contra diferentes bactérias, incluindo *S. aureus* sob

condições de escuro e claro e observaram que usando um laser diodo (664 nm) todas as bactérias irradiadas foram erradicadas (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001).

A resistência primária de fungos patogênicos aos agentes antifúngicos tradicionais é bem conhecida, por outro lado, a resistência secundária ou adquirida entre fungos oportunistas está em nítido crescimento. Neste contexto, a aplicação da TFD em pacientes com infecções fúngicas de pele tem considerável potencial para beneficiar-se deste recurso (JOHNSON et al., 1995).

Na aplicação clínica da TFD, Lyon e colaboradores, em 2011, demonstraram *in vivo* o sucesso da TFD com AM frente a agentes de cromoblastomicose (LYON et al., 2011). Em outro estudo desenvolvido pelo mesmo autor, utilizando o AM como FS, foi demonstrado que *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* foram sensíveis à atividade fotodinâmica *in vitro* (LYON et al., 2013).

Um estudo realizado por Mario e colaboradores, utilizando o AM como FS, demonstrou que os agentes de esporotricose foram sensíveis à atividade fotodinâmica *in vitro* (MARIO et al., 2014). Dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* também foram sensíveis à atividade fotodinâmica *in vitro* com compostos fenotiazínicos (RODRIGUES et al., 2012).

Um estudo realizado por Lu e colaboradores em 2017, avaliou os efeitos da TFD utilizando AM como FS contra 6 espécies fúngicas, incluindo *S. apiospermum*. Das 6 espécies, *S. apiospermum* foi a mais sensível a foto-inativação, com uma redução de UFC de até 5,2 log₁₀ (LU et al., 2017).

Não há estudos envolvendo *S. brevicaulis* e TFD utilizando FSs fenotiazínicos. Também não há estudos com TFD utilizando azul de toluidina como FS frente a *F. pedrosoi* e *S. apiospermum*.

3 ARTIGO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA FRENTE A AGENTES DE MICOSES CUTÂNEAS E SUBCUTÂNEAS

Os resultados que compõe essa dissertação estão apresentados sob forma de manuscrito, o qual está organizado nas seções resumo, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas. O manuscrito está formatado segundo as normas exigidas pela revista científica, a qual será submetido.

ARTIGO 1**Evaluation of photodynamic activity against cutaneous and subcutaneous mycosis agents**

Jéssica Tairine Keller^{1,2*}, Fernanda Baldissera Piasentin^{1,2}, Sydney Hartz Alves^{1,2}

Artigo será submetido no periódico **Mycopathologia**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Laboratório de Pesquisas micológicas, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil.

***Autor correspondente:** Jéssica Tairine Keller, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil. Phone/ Fax: +55 (55) 32208906. E-mail: jessicatairinekeller@gmail.com

ABSTRACT

Photodynamic therapy has been successfully applied in cutaneous and subcutaneous mycoses. In our study, we evaluated the *in vitro* photodynamic activity against *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Scedosporium apiospermum*, cutaneous and subcutaneous mycosis agents, using methylene blue and toluidine blue as photosensitizers and diode laser (InGaAlP). The results demonstrated that both methylene blue and toluidine blue were efficient in significantly reducing the growth of the agents tested. These pathogenic fungi affect immunocompetent and immunocompromised patients and are resistant to most conventional antifungal agents. In this context, photodynamic therapy emerges as an alternative treatment for cutaneous and subcutaneous mycoses. However, it requires experimental *in vivo* studies to prove its validity and ensure its effectiveness before expanding the use to clinic.

Keywords: Photodynamic activity; Phenothiazine photosensitizers; *Scopulariopsis brevicaulis*; *Fonsecaea pedrosoi*; *Scedosporium apiospermum*.

1 INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) consists in a combination of three factors: a) the photosensitizer (PS), which is able to selectively accumulating in damaged tissues or being metabolized by the target cells; b) visible light exposure with adequate wavelength and c) the presence of oxygen [1]. PDT action mechanism is based on the ability of PS compounds to generate highly reactive singlet oxygen after exposure to laser light. This singlet oxygen attacks the biological membranes and the resulting changes in cell permeability induce microbial damage [2]. In recent years, this technique has been very used for the neoplasias treatment, especially cutaneous [3,4], and microorganisms inactivation [5-7].

The main PSs used in modern clinical trials are the phenothiazine, toluidine blue O (TBO) and methylene blue (MB) salts, with absorption wavelengths of 600-660 nm. Both are clinically approved for human use and can effectively act on the fungal membrane causing structural damage [8-10]. Several authors have reported the efficiency of photodynamic activity using MB and TBO as PSs against a variety of microorganisms [11-16].

PDT is effective to eliminate microorganisms that cause mainly localized infections in the skin and oral cavity, since the main advantage of this technique is preventing the development of resistance to reactive oxygen species (ROS). This characteristic is due to the fact that these molecules reach several targets in the microorganism, causing oxidation reactions, in lipids, lysosomes, mitochondria, membrane proteins, so promoting cell death [11,17].

Onychomycoses are invasive fungal infections in the nails, representing up to 50% of onychopathies and approximately 30% of all dermatomycoses [18,19]. Non-

dermatophyte filamentous fungi such as *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp. and *Scopulariopsis brevicaulis* cause between 2% and 13% of cases [20-23]. *S. brevicaulis* is the most commonly isolated species of human infections and is reported as the causative agent of 1-10% of cases of non-dermatophytic onychomycosis [23]. Onychomycosis is one of the most difficult superficial mycoses to treat, because it has a chronic course with a relapses tendency [24].

Epidemiologically, chromoblastomycosis ranks second among subcutaneous mycoses, behind only sporotrichosis [25]. Chromoblastomycosis is characterized as chronic insidious fungal infection, usually involving lower limbs, whose lesions present as verrucous nodules and papules that, when they compromise an entire limb, determine pathological conditions with significant esthetic changes and severe impairment of their functions [26,27]. Five species of dematiaceous fungi are involved with the etiology of the disease, especially *Fonsecaea pedrosoi* [28]. The treatment of this mycosis is a therapeutic challenge for clinicians, since complete cure is difficult and recurrences are common [27,29].

Mycetomas are chronic subcutaneous infections caused by filamentous fungi (eumycetomas) inoculation or aerobic filamentous bacteria (actinomycetomas) that form grains in affected tissues [30]. *Scedoporium apiospermum* is one of the eumycetoma agents, forming white-colored grains on the surface of the affected skin [31]. Infection develops due to fungus traumatic implantation on the skin of the hands or feet (70-80%) more commonly, with a granulomatous inflammatory response in the deep dermis and subcutaneous tissue [32]. In contrast to antimicrobial treatment success in actinomycetomas, the eumycetomas treatment is a challenge because these agents show primary resistance to the antimycotics employed.

S. brevicaulis, *F. pedrosoi* and *S. apiospermum* are resistant to most of the conventional antifungal agents, requiring the study of therapeutic alternatives. PDT is an interesting alternative that deserves to be explored. Here the photodynamic activity was evaluated in inhibition of *in vitro* growth of *S. brevicaulis*, *F. pedrosoi* and *S. apiospermum* using MB and TBO as PSs.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganisms

Three clinical isolates were used: *S. brevicaulis*, *F. pedrosoi* and *S. apiospermum* previously identified according to physiological, morphological and biochemical characteristics. These clinical isolates belong to the fungal cultures collection of the Laboratory of Mycological Research (LAPEMI) of the University of Santa Maria, Brazil.

2.2 Inoculum preparation

The inoculums were prepared according to CLSI document M38-A2 [33].

2.3 Photodynamic activity

The photodynamic inactivation technique used was described by Lyon et al. [16] with modifications. MB and TBO, used as PSs in the technique, were purchased from Sigma Aldrich®. Both MB and TBO were solubilized in sterile distilled water and were tested at the final concentrations of 1, 2, 4 and 8 µg/mL. Volumes of 100 µL from each concentration were added with 100 µL of standardized inoculum pre-aliquoted into 96-well sterile microtiter plates. These suspensions were incubated for

1 hour in the dark at 35 °C. After that time, the tests were irradiated with a diode laser (InGaAlP; Theralase, DMC, São Carlos, Brazil) with a power of 100 mW, wavelength of 660 nm and a distance of 1 cm from the plate. The irradiation times were 50 seconds (15 J/cm²), 1 minute and 50 seconds (30 J/cm²), 3 minutes and 40 seconds (60 J/cm²) and 7 minutes and 30 seconds (120 J/cm²) with an irradiated area of 0.38 cm². The following controls were included: fungal suspension with saline solution without light irradiation (C1), fungal suspension and MB/TBO (8 µg/mL) without light irradiation (C2), fungal suspension with saline solution with 15 J/cm² (C3) light irradiation, fungal suspension with saline solution with 30 J/cm² (C4) light irradiation, fungal suspension with saline solution with 60 J/cm² (C5) light irradiation and fungal suspension with saline solution with light irradiation of 120 J/cm² (C6). The treatments consisted of fungal suspension, light irradiation and MB/TBO at concentrations of 1 µg/mL (T1), 2 µg/mL (T2), 4 µg/mL (T3) and 8 µg/mL (T4). Aliquots of 20 µL for each group were inoculated on Sabouraud dextrose agar and incubated at 35 °C for seven or more days until growth for counting of colony forming units (CFU). The photodynamic inactivation efficiency was evaluated by comparing the counts of the colonies after treatments T1, T2, T3, T4 with those obtained with non-irradiated control colonies and free from MB/TBO (C1). All tests were performed in triplicate.

2.4 Analysis of results

The C1 control group was considered as 100% growth for each set of tests. The Anova two-way test was used to compare the difference among C1 and the other groups, followed by the Newman-Keuls post-test. In all statistical tests, a level

of significance for 0.05% ($P \leq 0.05$) was considered. The analysis was performed using GraphPad Prism 6 software.

3 RESULTS

Our results showed that laser light exposure (InGaAlP) together with PS MB compared to control C1 significantly reduced the growth of *S. apiospermum* and *S. brevicaulis* strains using 8 $\mu\text{g/mL}$ of PS and a light irradiation of 60 J/cm^2 and 4 and 8 $\mu\text{g/mL}$ of PS and a light irradiation of 120 J/cm^2 . There was not growth inhibition of *F. pedrosoi*, promoted by the photodynamic activity, when MB was used as PS.

Exposure to laser light (InGaAlP), using TBO as PS agent, compared to control C1, promoted the growth reduction of the three species studied. For *F. pedrosoi*, the inhibition by the photodynamic activity was observed with 8 $\mu\text{g/mL}$ of PS and a light irradiation of 30 J/cm^2 ; for *S. apiospermum* the growth inhibition by photodynamic activity was observed with 8 $\mu\text{g/mL}$ of PS and a light irradiation of 15 J/cm^2 ; 2 and 4 $\mu\text{g/mL}$ of PS and 30 J/cm^2 irradiation; 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{g/mL}$ of PS and irradiation of 60 J/cm^2 and 1, 2 and 4 $\mu\text{g/mL}$ of PS and irradiation of 120 J/cm^2 . The growth inhibition of *S. brevicaulis* through the photodynamic activity occurred using concentrations 1 and 4 $\mu\text{g/mL}$ of PS and light irradiation of 30 J/cm^2 ; 2, 4 and 8 $\mu\text{g/mL}$ of PS and irradiation of 60 J/cm^2 and 120 J/cm^2 . Figures 1, 2, 3, 4, 5 and 6 show the results obtained.

4 DISCUSSION

The increase of drug-resistant pathogens drove researchers to explore new alternative approaches to infectious diseases, and PDT is one of them. The ability of

PDT to eliminate microorganisms has been described by several investigators and the data suggest that PDT is potentially effective against bacterial, viral, fungal and protozoal infections [34,35].

Interest in antifungal PDT has increased in recent years. Dovigo et al. [36,37] evaluated the efficacy of PDT against *Candida* species resistant to fluconazole and against cells in suspension or biofilms, concluding that the fungicidal effect of PDT is lineage dependent and that fluconazole resistant strains are less susceptible to PDT. Giroldo et al. [38] demonstrated that PDA with MB increases membrane permeability in *C. albicans*, which could decrease the resistance of this yeast to other antifungal agents. In this way, PDT also started to be an adjunct to conventional antifungal chemotherapy.

Investigations with filamentous fungi gained interest due to promising results obtained against superficial and cutaneous mycoses using PDT. *Trichophyton rubrum*, the main agent of dermatophytosis, has also been studied [13,39], and clinical analysis have demonstrated the effectiveness of PDT for superficial mycoses that present as dermatophytoses [40]. PDT also achieved a desirable results in non-dermatophytic onychomycosis [41].

In this study, show the ability of *in vitro* inhibition of fungal agents related to difficult mycoses such as onychomycosis caused by *S. brevicaulis*, chromoblastomycosis and mycetoma was demonstrated. Our results broaden the prospects of PDT use in subcutaneous mycoses. In 2013, Lyon et al. demonstrated the *in vitro* antifungal activity of laser light against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladosporium carrionii* using MB (32 mg/ml) as a photosensitizing agent [16]. Lu et al. in 2017, evaluated the effects of PDT using MB as PS against six fungal species,

including *S. apiospermum*. Of the six species, *S. apiospermum* was the most sensitive to photo-inactivation [42].

The fungal species studied present high percentages of primary resistance to several classes of antifungal and, when sensitive, the treatments are long resulting in the development of secondary resistance or treatment abandonment, compromising the therapy success. In this context, PDT imposes itself as a candidate to become an important alternative to the therapies currently employed. PDT can be combined with conventional antifungal agents by reducing relapses and administration time to antifungal agents, which may result in lower patient toxicity. In addition, in cases of chromoblastomycosis and mycetoma, the patient has very large injuries, which could be reduced by the use of PDT.

Both the cell wall and the fungal plasma membrane are negatively charged, which facility the connection of cationic PSs, such as phenothiazines. We believe that the fungal growth inhibition recorded are due to the positively charged phenothiazine PSs, interacting with the negative charges of the fungal wall.

Finally, the evidence of photodynamic activity on the studied agents allows us to propose that new studies be performed to ensure the introduction of this therapy in clinical practice.

5 ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Higer Education Personnel Training Coordination (CAPES), Brazil. Alves, S. H. thanks to CNPq (Brazil) by grant #302797/2016-5

6 DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there are not conflicts of interest.

REFERENCES

1. Menezes HD, et al. *In Vitro* Photodynamic Inactivation of Plant - Pathogenic Fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with Novel Phenothiazinium Photosensitizers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 80: 1623 – 1632.
2. Bliss JM, et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48: 2000 – 2006.
3. Bahner JD, Bordeaux JS. Non - melanoma skin cancers: photodynamic therapy, cryotherapy, 5 - fluororacil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2013; 31: 792 - 798.
4. Mroz P, et al. Photodynamic Therapy of Murine Mastocytoma Induces Specific Immune Responses against the Cancer/Testis Antigen P1A. *Cancer Research*. 2013; 73: 6462 - 6470.
5. Eaglesome MD, et al. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and bovine semen by photosensitive agents. *Veterinary Microbiology*. 1994; 38: 277 – 284.
6. Jori G, et al. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water - borne diseases. *Journal of Environmental, Pathology, Toxicology and Oncology*. 2011; 30: 261 – 271.
7. Pires L, et al. Photodynamic therapy for pythiosis. *Veterinary Dermatology*. 2013; 24: 130 – 136.
8. Calzavara – Pinton P, et al. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2012; 88: 512 – 522.

9. Dai T, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3: 1 - 16.
10. Plaetzer K, et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*. 2009; 24: 259 – 268.
11. Pereira Gonzales F, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infection. *Fungal Biology*. 2012; 116: 1 – 10.
12. Gonzales FP, et al. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochemistry and Photobiology*. 2010; 86: 653 – 661.
13. Baltazar LM, et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68: 354 – 361.
14. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low - power laser light. *Journal of Oral Pathology e Medicine*. 1993; 22: 354 – 357.
15. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram - positive and Gram - negative microorganisms. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2001; 29: 165 – 173.
16. Lyon JP, et al. *In vitro* photodynamic therapy against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*. *Mycoses*. 2013; 56: 157 – 161.
17. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2009; 9: 974 – 983.
18. Odds FC, et al. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub - Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1992; 30: 1 – 10.

19. Elewski BE. Onychomycosis: Treatment, quality of life, and economic issues. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2000; 1: 19 – 26.
20. Elewski BE, et al. Efficacy, safety and tolerability of topical terbinafine nail solution in patients with mild – to - moderate toenail onychomycosis: Results from three randomized studies using double - blind vehicle - controlled and open – label active - controlled designs. *Journal of the European Academy of Dermatololy and Venereology*. 2013; 27: 287 – 294.
21. Garmendia JL, Viedma PI, Arza JM. Onicomicosis: diagnóstico y tratamiento. *Información Terapeutica del Sistema Nacional de Salud*. 2008; 32: 83 – 92.
22. Lopez – Jodra O, Torres – Rodriguez JM. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 1999; 16: 11 – 15.
23. Moreno G, Arenas R. Other fungi causing onychomycosis. *Clinics in Dermatology*. 2010; 28: 160 – 163.
24. Salas – Campos I, Chavez – Madrigal O. Agentes de Onicomicosis en Costa Rica. *Revista costarricense de ciencias médicas*. 2004; 25: 43 – 47.
25. Pang KR, et al. Subcutaneous fungal infections. *Dermatologic Therapy*. 2004; 17: 523 – 531.
26. Rivitti EA, et al. Deep fungal infections in tropical countries. *Clinics in Dermatology*. 1999 ; 17 : 171 – 190.
27. Queiroz – Telles F, et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*. 2009; 47: 3 – 15.
28. Hamza SH, et al. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2003; 30: 340 – 343.

29. Queiroz – Telles F, et al. Subcutaneous mycoses. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2003; 17: 59 – 85.
30. Van de Sande WW. Global burden of human mycetoma: a systematic review and meta - analysis. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2013; 7: 1 – 11.
31. Nenoff P, et al. Eumycetoma and actinomycetoma – an update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. *Journal of the European Academy of Dermatololy and Venereology*. 2015; 29: 1873 – 1883.
32. Fahal AH, et al. Abdominal wall mycetoma: an unusual presentation, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994; 88: 78 – 80.
33. CLSI. M38 – A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
34. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004; 3: 436 – 450.
35. Krausz A, Friedman AJ. News, views, & reviews: antimicrobial photodynamic therapy: applications beyond skin cancer. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2014; 13: 624 – 626.
36. Dovigo LN, et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011; 54: 123 – 130.
37. Dovigo LN, et al. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by Photogem®. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010; 41: 42 – 49.

38. Giroldo LM, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers in Medical Science*. 2009; 24: 109 – 112.
39. Rodrigues GB, et al. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2012; 116: 89 – 94.
40. Sotiriou E, et al. Photodynamic therapy for distal and lateral subungual toenail onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*: Preliminary results of a single - centre open trial. *Acta Dermato – Venereologica*. 2010; 90: 216 – 217.
41. Gilaberte, Y. et al. Treatment of refractory fingernail onychomycosis caused by nondermatophyte molds with methylaminolevulinate photodynamic therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011; 65: 669 – 671.
42. Lu Q, et al. Effects of Photodynamic Therapy on the Growth and Antifungal Susceptibility of *Scedosporium* and *Lomentospora* spp. *Mycopathologia*. 2017; 182: 1037 – 1043.

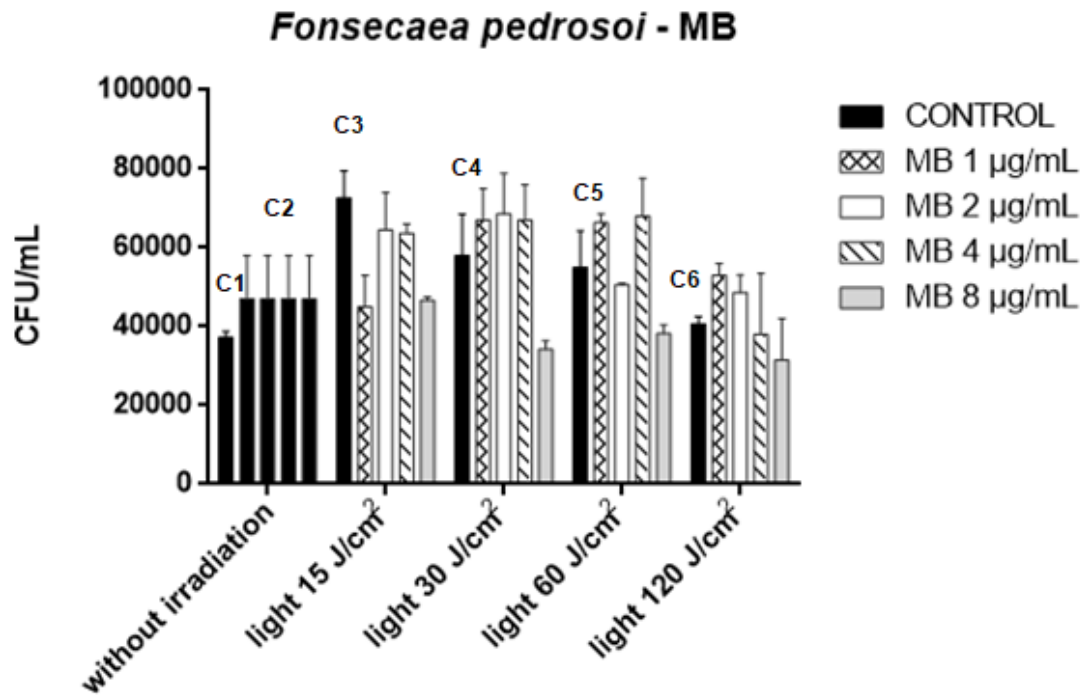


Fig. 1 Effect of photodynamic inactivation using MB and laser light (InGaAIP) against *F. pedrosoi*. C1: Isolated without MB and without irradiation; C2: Isolate exposed to 8 µg/mL of MB without irradiation; C3: Isolated without MB and light irradiation of 15 J/cm²; C4: Isolated without MB and light irradiation of 30 J/cm²; C5: Isolated without MB and light irradiation of 60 J/cm²; C6: Isolated without MB and light irradiation of 120 J/cm².(*) The growth reduction was statistically significant ($P \leq 0.05$).

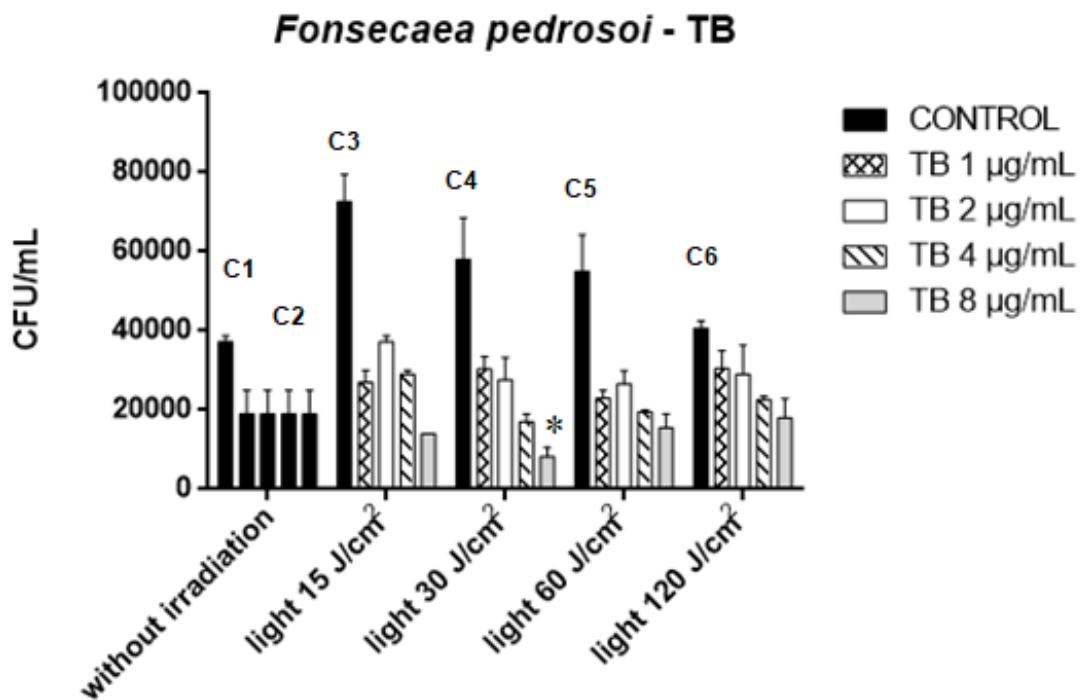


Fig. 2 Effect of photodynamic inactivation with TB and laser light (InGaAIP) against *F. pedrosoi*. C1: Isolated without TB and without irradiation; C2: Isolate exposed to 8 µg/mL of TB without irradiation; C3: Isolated without AT and light irradiation of 15 J/cm²; C4: Isolated without TB and light irradiation of 30 J/cm²; C5: Isolated without TB and light irradiation of 60 J/cm²; C6: Isolated without TB and light irradiation of 120 J/cm².(*) The growth reduction was statistically significant ($P \leq 0.05$).

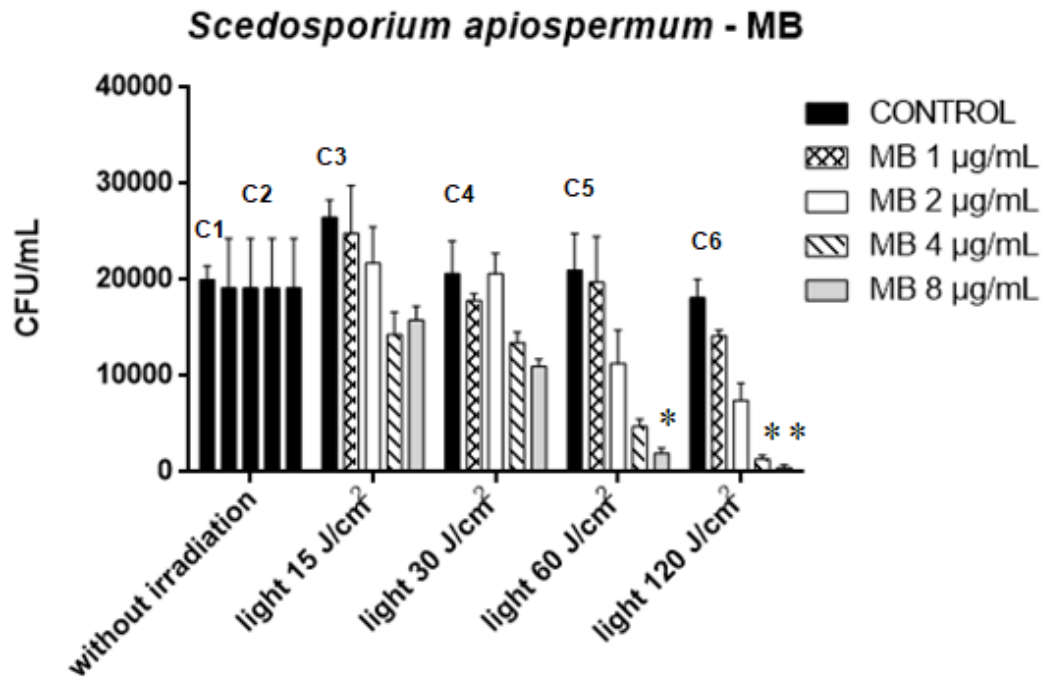


Fig. 3 Effect of photodynamic inactivation with MB and laser light (InGaAIP) against *S. apiospermum*. C1: Isolated without MB and without irradiation; C2: Isolate exposed to 8 µg/mL of MB without irradiation; C3: Isolated without MB and light irradiation of 15 J/cm²; C4: Isolated without MB and light irradiation of 30 J/cm²; C5: Isolated without MB and light irradiation of 60 J/cm²; C6: Isolated without MB and light irradiation of 120 J/cm². (*) The growth reduction was statistically significant ($P \leq 0.05$).

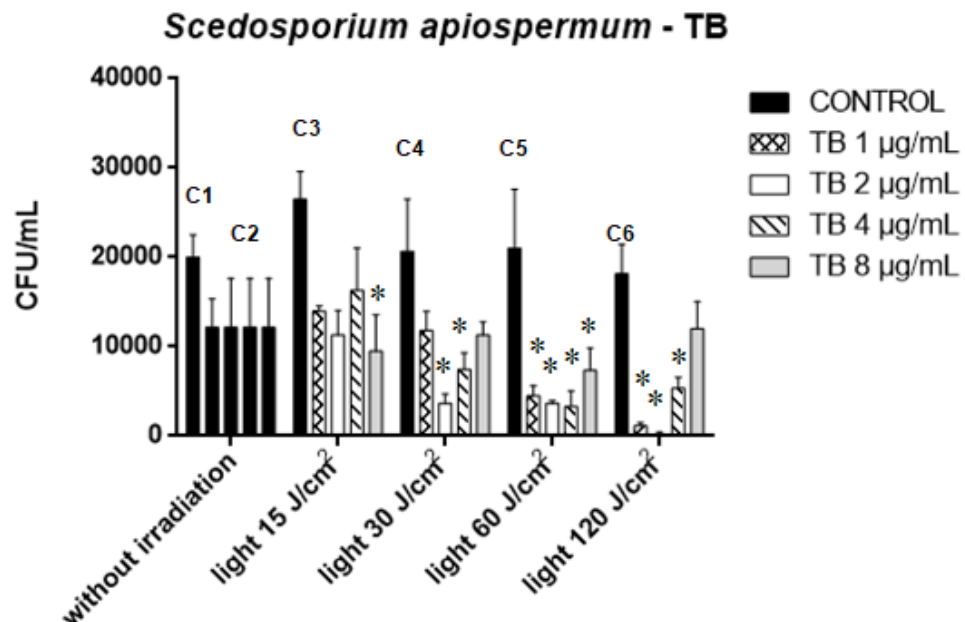


Fig. 4 Effect of photodynamic inactivation with TB and laser light (InGaAIP) against *S. apiospermum*. C1: Isolated without TB and without irradiation; C2: Isolate exposed to 8 µg/mL of TB without irradiation; C3: Isolated without AT and light irradiation of 15 J/cm²; C4: Isolated without TB and light irradiation of 30 J/cm²; C5: Isolated without TB and light irradiation of 60 J/cm²; C6: Isolated without TB and light irradiation of 120 J/cm². (*) The growth reduction was statistically significant ($P \leq 0.05$).

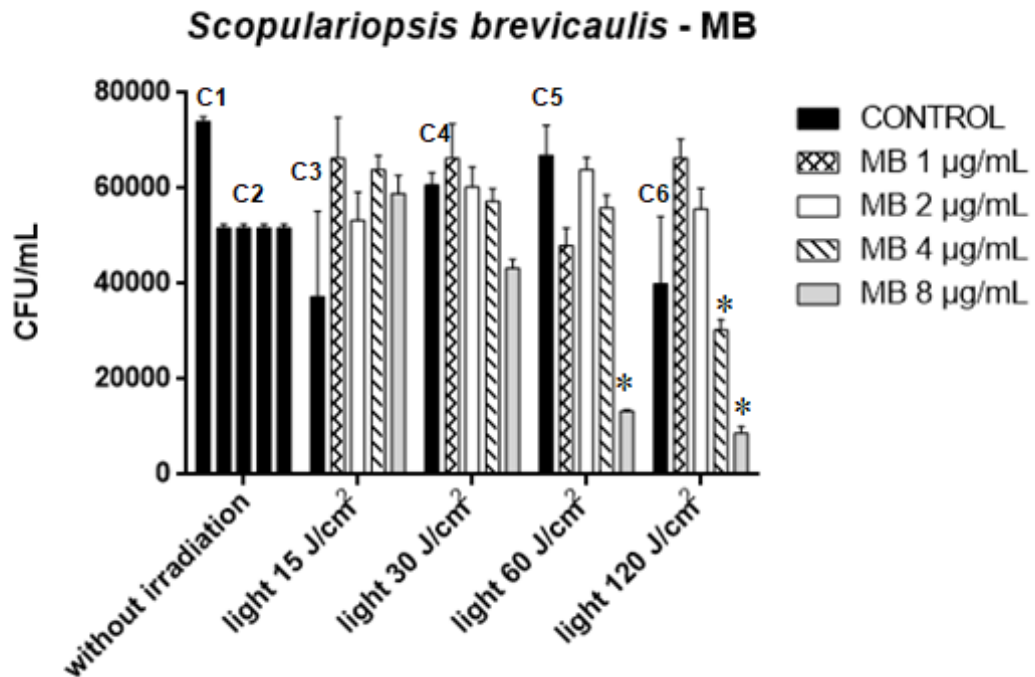


Fig. 5 Effect of photodynamic inactivation with MB and laser light (InGaAlP) against *S. brevicaulis*. C1: Isolated without MB and without irradiation; C2: Isolate exposed to 8 µg/mL of MB without irradiation; C3: Isolated without MB and light irradiation of 15 J/cm²; C4: Isolated without MB and light irradiation of 30 J/cm²; C5: Isolated without MB and light irradiation of 60 J/cm²; C6: Isolated without MB and light irradiation of 120 J/cm². (*) The growth reduction was statistically significant ($P \leq 0.05$).

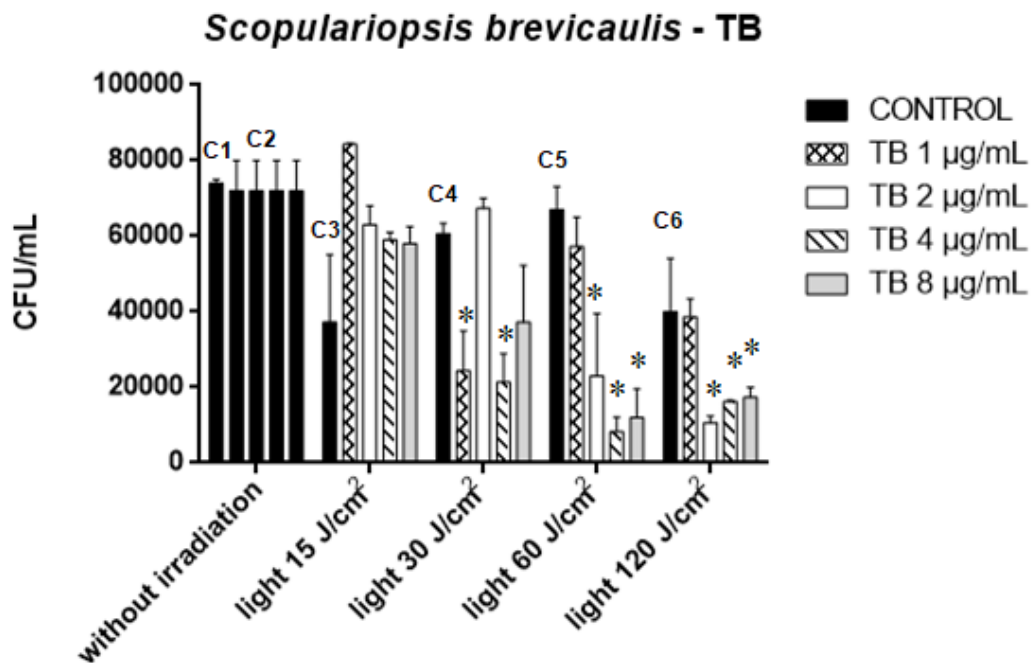


Fig. 6 Effect of photodynamic inactivation with TB and laser light (InGaAlP) against *S. brevicaulis*. C1: Isolated without TB and without irradiation; C2: Isolate exposed to 8 µg/mL of TB without irradiation; C3: Isolated without AT and light irradiation of 15 J/cm²; C4: Isolated without TB and light irradiation of 30 J/cm²; C5: Isolated without TB and light irradiation of 60 J/cm²; C6: Isolated without TB and light irradiation of 120 J/cm². (*) The growth reduction was statistically significant ($P \leq 0.05$).

4 CONCLUSÕES

S.brevicaulis, *F. pedrosoi* e *S. apiospermum* são agentes de micoses cutâneas e subcutâneas, respectivamente, que apresentam dificuldades no tratamento. A TFD evidenciou atividade inibitória sobre estes agentes nas seguintes condições:

- a) Utilizando-se o AM como FS: na concentração de 8 µg/mL e irradiação luminosa de 60 J/cm² e nas concentrações de 4 e 8 µg/mL e irradiação luminosa de 120 J/cm² frente a *S. brevicaulis* e *S. apiospermum*. Não observou - se a inibição do crescimento de *F. pedrosoi*;
- b) Utilizando-se o AT como FS: na concentração de 8µg/mL e irradiação luminosa de 30 J/cm² frente a *F. pedrosoi*. Na concentração de 8 µg/mL e irradiação luminosa de 15 J/cm²; 2 e 4 µg/mL e irradiação luminosa de 30 J/cm²; 1, 2,4 e 8 µg/mL e irradiação luminosa de 60J/cm² e 1, 2 e 4 µg/mL e irradiação luminosa de 120J/cm² frente a *S. apiospermum*. Nas concentrações de 1 e 4 µg/mL e irradiação luminosa de 30 J/cm²; 2, 4 e 8 µg/mL e irradiação luminosa de 60 e 120 J/cm² frente a *S. brevicaulis*;
- c) Observou-se que o AT foi mais eficiente do que o AM na inibição fotodinâmica das 3 espécies testadas.

REFERÊNCIAS

- AJELLO, L. The isolation of *Allescheria boydii* shear, an etiologic agent of mycetomas, from soil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 2, p. 227-238, 1952.
- AL-DOORY, Y. Chromomycosis. In: DI SALVO, A. F. **Occupational mycoses**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p. 95-121.
- AMEEN, M.; ARENAS, R. Developments in the management of mycetomas. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 34, n. 1, p. 1-7, 2009.
- ANDRADE, T. S. et al. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. **Mycoses**, v. 47, n. 5-6, p. 216-221, 2004.
- ANTONELLO, V. S. et al. Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5-flucytosine association. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 6, p. 329-331, 2010.
- ARBOLEDA, A. et al. Assessment of rose bengal versus riboflavin photodynamic therapy for inhibition of fungal keratitis isolates. **American Journal of Ophthalmology**, v. 158, n. 1, p. 64-70, 2014.
- AYATOLLAHI MOUSAVI, S. A.; SALARI, S.; HADIZADEH, S. Evaluation of antifungal effect of silver nanoparticles against *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 38-42, 2015.
- AYDIN S. et al. Treatment of two postoperative endophthalmitis cases due to *Aspergillus flavus* and *Scopulariopsis* spp., with local and systemic antifungal therapy. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 87, p. 1-5, 2007.
- BACELLAR, I. O. L. et al. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 4, p. 801-813, 2014.
- BAHNER, J. D.; BORDEAUX, J. S. Non - melanoma skin cancers: photodynamic therapy, cryotherapy, 5 - fluororacil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 6, p. 792-798, 2013.
- BALTAZAR, L. M. et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 354-361, 2013.
- BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: na effective alternativ approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 202, p. 1-11, 2015.

- BARDE, A. K.; SINGH, S. M. A case of onychomycosis caused by *Curvularia lunata* (Wakker) boedijn/ein fall einer onychomykose durch *Curvularia lunata* (Wakker) boedijn. **Mycoses**, v. 26, n. 6, p. 311-316, 1983.
- BASSANI, A. C.; BASTOS, J. R. M. Considerações sobre o raio laser e sua aplicação em Odontologia. **Odontologia Capixaba**, v. 20, n. 21, p. 36-39, 1992.
- BEIER, F. et al. Successful treatment of *Scedosporium apiospermum* soft tissue abscess with caspofungin and voriconazole in a severely immunocompromised patient with acute myeloid leukemia. **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 538-542, 2010.
- BERTOLONI, G. et al. Factors influencing the haematoporphyrin - sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 4, p 957-966, 1989.
- BLIGNAUT, E. et al. Clade - related amphotericin B resistance among South African *Candida albicans* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 53, n. 1, p. 29-31, 2005.
- BLISS, J. M. et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2000-2006, 2004.
- BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAÚL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, v. 44, n. 1-2, p. 1-7, 2001.
- BONIFAZ, A.; PAREDES-SOLIS, V.; SAÚL, A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. **Expert opinion on Pharmacotherapy**, v. 5, n. 2, p. 247-254, 2004.
- BONIFAZ, A. et al. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 16, n. 1, p. 47-51, 2005.
- BONIFAZ, A.; CRUZ-AGUILAR, P.; PONCE, R. M. Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. **European Journal of Dermatology**, v. 17, n. 1, p. 70-72, 2007.
- BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: Chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 8, n. 8, p. 619-627, 2010.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 1-9, 2012.
- BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R. G.; GENOVESE, W. J. **Laser na Odontologia**. 1. ed. São Paulo: Pancast, 1991.
- BRUGNERA JÚNIOR, A. et al. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. 1. ed. São Paulo: Santos, 2003.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B.; ZANIN, F. A. A. Dosimetria da laserterapia de baixa intensidade na Odontologia. **Revista Brasileira de Laser em Medicina**, v. 1, p. 30-32, 2007.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2005.

CALZAVARA-PINTON, P. et al. Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 512-522, 2012.

CARILLO-MUNOZ, A. J. et al. *In vitro* antifungal activity of voriconazole against dermatophytes and superficial isolates of *Scopulariopsis brevicaulis*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, n. 2, p. 110-113, 2005.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2005.

CAWCUTT, K.; BADDOUR, L. M.; BURGESS, M. A case of *Scopulariopsis brevicaulis* endocarditis with mycotic aneurysm in an immunocompetent host. **Case Reports in Medicine**, v. 2015, n. 872871, p. 1-4, 2015.

COHEN, P. R.; SCHER, R. K. Topical and surgical treatment of onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3 (part. 2), p. 74-77, 1994.

CORTEZ, K. J. et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 157-197, 2008.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 187-198, 2008.

CRAIG, R. A. et al. Photosensitisers – the progression from photodynamic therapy to anti - infective surfaces. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 1, p. 85-101, 2015.

CRUZ, R.; VIEILLE, P.; OSCHILEWSKI, D. Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfocutánea. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 4, p. 401-405, 2012.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. *Scopulariopsis brevicaulis*, a fungal pathogen resistant to broad - spectrum antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2339-2341, 2003.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. *In vitro* activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2248-2250, 2006.

DAI, T. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 120, p. 1-16, 2012.

DEL PALACIO, A.; PAZOS, C.; CUÉTARA, S. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 19, n. 9, p. 439-442, 2001.

DENG, S. et al. Combination of amphotericin B and terbinafine against melanized fungi associated with chromoblastomycosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 1-16, 2018.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245-254, 2004.

DENNING, D. W. Can we prevent azole resistance in fungi? **The Lancet**, v. 346, n. 8973, p. 454-455, 1995.

DODGSON, A.R. et al. Clade - specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2223-2227, 2004.

DRAKE, L. A. et al. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: *tinea capitis* and *tinea barbae*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 290-294, 1996.

EAGLESOME, M. D. et al. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and bovine semen by photosensitive agents. **Veterinary Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 277-284, 1994.

ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: Treatment, quality of life, and economic issues. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 1, n. 1, p. 19-26, 2000.

ELEWSKI, B. E. et al. Efficacy, safety and tolerability of topical terbinafine nail solution in patients with mild – to - moderate toenail onychomycosis: Results from three randomized studies using double - blind vehicle - controlled and open – label active - controlled designs. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 3, p. 287-294, 2013.

EL-GOHARY, M. et al. Topical antifungal treatments for *tinea cruris* and *tinea corporis*. **The Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 8, 2014.

ESTRADA, R. et al. Eumycetoma. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 389-396, 2012.

FAHAL, A. H. et al. Abdominal wall mycetoma: an unusual presentation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 78-80, 1994.

FAHAL, A. H. Mycetoma. **Khartoum Medical Journal**, v. 4, n. 1, p. 514-523, 2011.

FAHAL, A. H. et al. The safety and efficacy of itraconazole for the treatment of patients with eumycetoma due to *Madurella mycetomatis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 3, p. 127-132, 2011.

FARWA, U. et al. Non-dermatophyte moulds as pathogens of onychomycosis. **Journal of the College of Physicians Surgeons Pakistan**, v. 21, n. 10, p. 597-600, 2011.

FDA. Food and Drug Administration. **FDA Drug Safety Communication: FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems**. Silver Spring: FDA, 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm362415.htm>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

GAITANIS, G. et al. Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 4, p. 455-463, 2013.

GARMENDIA, J. L.; VIEDMA, P. I.; ARZA, J. M. Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud**, v. 32, n. 3, p. 83-92, 2008.

GENOVESE, W. J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em Odontologia**. 1. ed. São Paulo: Lovise, 2000.

GEZUELE, E.; MACKINNON, J. E.; CONTI-DÍAZ, I. A. The frequent isolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. **Sabouraudia**, v. 10, n. 3, p. 266-273, 1972.

GILABERTE, Y. et al. Treatment of refractory fingernail onychomycosis caused by nondermatophyte molds with methylaminolevulinate photodynamic therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 669-671, 2011.

GILGADO, F. et al. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 4930-4942, 2005.

GRANT, S. M.; CLISSOLD, S. P. Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. **Drugs**, v. 37, n. 3, p. 310-344, 1989.

GÜNDÜZ, K. et al. A case of mycetoma successfully treated with itraconazole and co-trimoxazole. **Mycoses**, v. 49, n. 5, p. 436-438, 2006.

GUPTA, A. K.; TABORDA, P. R.; SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. **Medical Mycology**, v. 40, n. 5, p. 529-534, 2002.

HAMBLIN, M. R. et al. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by *in vivo* bioluminescence imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 1, p. 51-57, 2002.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HAMZA, S. H. et al. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, n. 5, p. 340-343, 2003.

HART, A. P. et al. Cerebral phaeohyphomycosis caused by a dematiaceous *Scopulariopsis* species. **Clinical Neuropathology**, v. 20, n. 5, p. 224-228, 2001.

HATTORI, N. et al. Onychomycosis caused by *Fusarium proliferatum*. **The British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 3, p. 647-649, 2005.

HAUSMAN, W. Diesensibilisierende wirkung des hematoporphyrins. **Biochemische Zeitschrift**, v. 30, p. 276, 1911.

HAY, R.J. New developments in antifungals. **International Journal of Dermatology**, v. 2, n. 2, p. 65-69, 1999.

HJIRA, N. et al. Madura foot: report of a eumycetoma Moroccan case. **Journal of Dermatology e Dermatologic Surgery**, v. 19, n. 2, p. 143-145, 2015.

HOOG, G. S. et al. **Atlas of clinical fungi**. 4. ed. [online]. Utrecht, NL: CBS Knaw, 2014.

ISSAKAINEN, J. et al. Occurrence of *Scopulariopsis* and *Scedosporium* in nails and keratinous skin. A 5-year retrospective multi-center study. **Medical Mycology**, v. 45, n. 3, p. 201-209, 2007.

ISSAKAINEN, J. et al. Deep, respiratory tract and ear infections caused by *Pseudallescheria* (*Scedosporium*) and *Microascus* (*Scopulariopsis*) in Finland. A 10 - year retrospective multi - center study. **Medical Mycology**, v. 48, n. 3, p. 458-465, 2010.

IWEN, P. C. et al. Invasive *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an immunocompromised patient and review of prior cases caused by *Scopulariopsis* and *Microascus* species. **Medical Mycology**, v. 50, n. 6, p. 561-569, 2012.

JEREZ, R. et al. Actinomycotic mycetoma due to *Actinomadura madurae*. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 29, n. 4, p. 459-463, 2012.

JESIONEK, H.; TAPPEINER, H. V. Therapeutische Versuche mit Fluoreszierenden Stoffen. **Munchener Medizinische Wochenschrift**, v. 47, p. 2024-2044, 1903.

JOHNSON, E. M. et al. Emergence of azole drug resistance in *candida* species from HIV - infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 103-114, 1995.

JORI, G. et al. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water - borne diseases. **Journal of Environmental, Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 30, n. 3, p. 261-271, 2011.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389-413, 2000.

KANTARCIOGLU, A. S.; DE HOOG, G. S.; GUARRO, J. Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2012.

KANTARCIOGLU, S. A.; YÜCEL, A. Pseudallescheriasis cases identified at department of microbiology and clinical microbiology, Cerrahpasa Medical Faculty and European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Pseudallescheriasis Study Group. **Cerrahpasa Journal of Medicine**, v. 36, p. 90-96, 2005.

KATZ, H. I. Possible drug interactions in oral treatment of onychomycosis. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 87, n. 12, p. 571-574, 1997.

KOCHEVAR, I. E. et al. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1280, n. 2, p. 223-230, 1996.

KRZYSCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYNSKA, M.; PIASZCZYNSKI, M. Chromoblastomycosis. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 31, n. 5, p. 310-321, 2014.

LACKNER, M. et al. Severe prosthetic joint infection in an immunocompetent male patient due to a therapy refractory *Pseudallescheria apiosperma*. **Mycoses**, v. 54, n. 3, p. 22-27, 2011.

LACROIX, C. et al. *Madurella mycetomatis* mycetoma treated successfully with oral voriconazole. **The British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 5, p. 1067-1068, 2005.

LEE, M. W. et al. Mycetoma caused by *Acremonium falciforme*: successful treatment with itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 5 (pt. 2), p. 897-900, 1995.

LOO, D. S. Onychomycosis in the elderly: Drug treatment options. **Drugs e Aging**, v. 24, n. 4, p. 293-302, 2007.

- LOPEZ-JODRA, O.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, n. 1, p. 11-15, 1999.
- LOULERGUE, P. et al. Successful treatment of black - grain mycetoma with voriconazole. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1106 – 1107, 2006.
- LU, Q. et al. Effects of photodynamic therapy on the growth and antifungal susceptibility of *Scedosporium* and *Lomentospora* spp. **Mycopathologia**, v. 182, n. 11-12, p. 1037-1043, 2017.
- LYON, G. M. et al. Population - based surveillance and a case - control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 34-39, 2003.
- LYON, J. P. et al. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 293-297, 2011.
- LYON, J. P. et al. *In vitro* photodynamic therapy against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*. **Mycoses**, v. 56, n. 2, p. 157-161, 2013.
- MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
- MACURA, A. B.; SKÓRA, M. 21-year retrospective study of the prevalence of *Scopulariopsis brevicaulis* in patients suspected of superficial mycoses. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 32, n. 2, p. 189-194, 2015.
- MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.
- MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 974-983, 2009.
- MARIO, D. A. N. et al. *In vitro* photodynamic inactivation of *Sporothrix schenckii* complex species. **Medical Mycology**, v. 52, n. 7, p. 770-773, 2014.
- MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S. **Laser em Odontologia**. 1. ed. São Paulo: Santos, 2001.
- MENEZES, H. D. **Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos**. 2012. 149f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2012.
- MIDGLEY, G.; MOORE, M. K. Onychomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, n. 3, p. 113-117, 1998.

- MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred - year history of PDT. **Anticancer Research**, v. 23, n. 5A, p. 3591-3600, 2003.
- MOHAMED, N. A.; FAHAL, A. H. Mycetoma pulmonary secondaries from a gluteal eumycetoma: an unusual presentation. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1-6, 2016.
- MONTEROA, L. A. et al. Lesiones nodulares em retropié en un paciente con trasplante renal. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 22, n. 9, p. 551-552, 2004.
- MORENO, G.; ARENAS, R. Other fungi causing onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 160-163, 2010.
- MORIO, F. et al. Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double - lung transplantation in patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1978-1982, 2010.
- MORTON, C. O.; CHAU, M.; STACK, C. *In vitro* combination therapy using low dose clotrimazole and photodynamic therapy leads to enhanced killing of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 261, p. 1-9, 2014.
- MOTAMEDI, M. et al. Growing incidence of non-dermatophyte onychomycosis in Tehran, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1-6, 2016.
- MROZ, P. et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 2011.
- MROZ, P. et al. Photodynamic therapy of murine mastocytoma induces specific immune responses against the cancer/testis antigen P1A. **Cancer Research**, v. 73, n. 21, p. 6462-6470, 2013.
- NAIDU, J.; SINGH, S. M.; POURANIK, M. Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brumptii*. A case report and sensitivity studies. **Mycopathologia**, v. 113, n. 3, p. 159-164, 1991.
- NAMRATHA N. et al. Chromoblastomycosis due to *Cladosporium carrionii*. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 2, n. 1, p. 47-48, 2010.
- NEGRONI, R. et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 6, p. 339-346, 2005.
- NENOFF, P. et al. Mycology – anupdate. Part 1: Dermatmycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 12, n. 3, p. 188-210, 2014.

NENOFF, P. et al. Eumycetoma and actinomycetoma – an update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 10, p. 1873-1883, 2015.

NYMAN, E. S.; HYNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 1-2, p. 1-28, 2004.

ODDS, F. C. et al. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub - Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 1992.

OLIVEIRA, C. A.; MACHADO, A. E.; PESSINE, F. B. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.113, n. 1, p. 69-78, 2005.

OLIVEIRA, F. M. et al. *Scedosporium apiospermum* eumycetoma successfully treated with oral voriconazole: report of a case and review of the Brazilian reports on scedosporiosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 121-123, 2013.

ORTH, K. et al. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 57, n. 2-3, p. 186-192, 2000.

PANIZ-MONDOLFI, A. E. et al. Extensive chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* successfully treated with a combination of amphotericin B and itraconazole. **Medical Mycology**, v. 46, n. 2, p. 79-84, 2008.

PAPPAS, P. G. et al. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 65-70, 2000.

PARK, S. G. et al. A case of chromoblastomycosis with an unusual clinical manifestation caused by *Phialophora verrucosa* on an unexposed area: Treatment with a combination of amphotericin B and 5-flucytosine. **The British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 3, p. 560-564, 2005.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 14, n. 1-2, p. 3-22, 1992.

PEREA, S. et al. Prevalence and risk factors of *tinea unguium* and *tinea pedis* in the general population in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3226-3230, 2000.

PEREIRA GONZALES, F.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fungal Biology**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2012.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

PINDYCKA-PIASZCZYNSKA, M. et al. Chromoblastomycosis as an endemic disease in temperate Europe: First confirmed case and review of the literature. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 391-398, 2014.

PIRACCINI, B. M.; ALESSANDRINI, A. Onychomycosis: a review. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 1, p. 30-43, 2015.

PIRES, L. **Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* – estudo *in vitro* e *in vivo***. 2012. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, SP, 2012.

PIRES, L. et al. Photodynamic therapy for pythiosis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 130-136, 2013.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

PUJOL, C.; PFALLER, M. A.; SOLL, D. R. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 262-266, 2004.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 3-15, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225-236, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. C. L. Chromoblastomycosis in the clinical practice. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 312-319, 2012.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 477-488, 2013.

RAAB, O. Ueber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoria. **Zeitschrift Für Biologie**, v. 39, p. 524-546, 1900.

RAMANI, R.; RAMANI, A.; SHIVANANDA, P. G. *Penicillium* species causing onychomycosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 40, n. 2, p. 87-88, 1994.

RAMOS E SILVA, M. et al. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 616-627, 2012.

RELLOSO, S. et al. Onicomycosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 3, p. 157-163, 2012.

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. Melanized fungi in human disease: clinical. **Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 884-928, 2010.

RIPPON, J. **Medical mycology**: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1988.

ROBERTS-HARRY, D. Lasers in Orthodontics. **British Journal of Orthodontics**, v. 21, n. 3, p. 308-312, 1994.

RODRIGUES, G. B. **Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão**. 2012. 119f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2012.

RODRIGUES, G. B. et al. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 116, p. 89-94, 2012.

ROMANO, C.; PACCAGNINI, E.; DIFONZO, E. M. Onychomycosis caused by *Alternaria* spp. in Tuscany, Italy from 1985 to 1999. **Mycoses**, v. 44, n. 3-4, p. 73-76, 2001.

SALAS-CAMPOS, I.; CHAVEZ-MADRIGAL, O. Agentes de Onicomycosis en Costa Rica. **Revista Costarricense de Ciencias Médicas**, v. 25, n. 3-4, p. 43-47, 2004.

SAMAILA, M. O.; ABDULLAHI, K. Cutaneous manifestations of deep mycosis: an experience in a tropical pathology laboratory. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 282-286, 2011.

SCHERER, H. Chemisch – physikalische untersuchungen. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v. 40, p. 1-64, 1841.

SHAYER, C. M. et al. Fatal *Scopulariopsis* infection in a lung transplant recipient: lessons of organ procurement. **American Journal of Transplantation**, v. 14, n. 12, p. 2893-2897, 2014.

SIGURGEIRSSON, B.; BARAN, R. The prevalence of onychomycosis in the global population: a literature study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 11, p. 1480-1491, 2013.

SKÓRA, M.; MACURA, A. B.; BULANDA, M. *In vitro* antifungal susceptibility of *Scopulariopsis brevicaulis* isolates. **Medical Mycology**, v. 52, n. 7, p. 723-727, 2014.

SKORA, M.; BULANDA, M.; JAGIELSKI, T. *In vitro* activities of a wide panel of antifungal drugs against various *Scopulariopsis* and *Microascus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5827-5829, 2015.

SOPTA, J. et al. *Pseudoallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*), cause of mycotic granulomatous osteomyelitis - case diagnosis. **Srp Arh Celok Lek**, v. 133, n. 7-8, p. 366-369, 2005.

SOUZA, L. W; SOUZA, S. V; BOTELHO, A. C. Distal and lateral toenail onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*: treatment with photodynamic therapy based on methylene blue dye. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 184-186, 2014.

TAKASAKI, A. A. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri - implant diseases. **Periodontology 2000**, v. 51, n. 1, p. 109-140, 2009.

TAPPEINER, H, V. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. **Munchener Medizinische Wochenschrift**, v. 47, p. 5-7, 1900.

TAPPEINER, H. V.; JODLBAUER, A. Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoan und Enzyme. [On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes]. **Deutsches Archiv Fur Klinische Medizin**, v. 80, p. 427-487, 1904.

TAPPEINER, H. V.; JODLBAUER, A. **Die sensibilisierende wirkung fluoriszierender substanzer**. Gesamte Untersuchungen uber die photodynamische Erscheinung. Leipzig: FCW Vogel, 1907.

TAROZZI, G. Ricerche anatomo - patologiche, bacteriologiche e sperimentali sopra un caso di actinomicosi del piede. **Arch. Perle. Sc. Med.**, v. 33, p. 553-632, 1909.

THOMAS, J. et al. Toenail onychomycosis: An important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 497-519, 2010.

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; NETO, C. F. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403-408, 2012.

TORTORANO, A. M. et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, suppl. 3, p. 27-46, 2014.

TÓTH, E. J. et al. Recurrent *Scedosporium apiospermum* mycetoma successfully treated by surgical excision and terbinafine treatment: a case report and review of the literature. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 31, p. 1-9, 2017.

- TSCHEN, J. A. et al. Chromomycosis: the association of fungal elements and wood splinters. **Archives of Dermatology**, v. 120, n. 1, p. 107-108, 1984.
- USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram - positive and Gram - negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.
- USUDA, J. et al. Photodynamictherapy (PDT) for lung cancers. **Journal of Thoracic Oncology**, v.1, n. 5, p. 489-493, 2006.
- VAN DE SANDE, W. W. Global burden of human mycetoma: a systematic review and meta - analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. 1-11, 2013.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **The Journal of antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p 13-28, 1998.
- WALSH, T. J. et al. New targets and delivery systems for antifungal therapy. **Medical Mycology**, v. 38, n. S1, p. 335-347, 2000.
- WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.
- WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; SALINAS-CARMONA, M. C. Mycetoma. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 195-202, 2007.
- WELSH, O.; ARENAS, R. Subcutaneous mycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 367-368, 2012.
- WELSH, O. et al. Mycetoma medical therapy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1-8, 2014.
- WHITE, T. C. et al. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 8, p. 1-16, 2014.
- WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low - power laser light. **Journal of Oral Pathology e Medicine**, v. 22, n. 8, p. 354-357, 1993.
- WILSON, M.; YIANNI, C. Killing of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* by low - power laser light. **Journal of Medical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 62-66, 1995.
- WU, C. Y. et al. Cutaneous granulomatous infection caused by *Scopulariopsis brevicaulis*. **Acta Dermato – Venereologica**, v. 89, n. 1, p. 103-104, 2009.
- YANG, Q.; WEI, J.; CHEN, Z. Fatal bronchial invasion of *Scopulariopsis brevicaulis* in an acute monocytic leukemia patient. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 369-371, 2012.
- ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species photodynamic therapy. **The British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 2, p. 274-278, 2001.

ZEINA, B. et al. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. **The British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 4, p. 568-573, 2002.

ZEIN, H. A. et al. Predictors of cure, amputation and follow - up dropout among patients with mycetoma seen at the Mycetoma Research Centre, University of Khartoum, Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 11, p. 639-644, 2012.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 100-112, 2016.